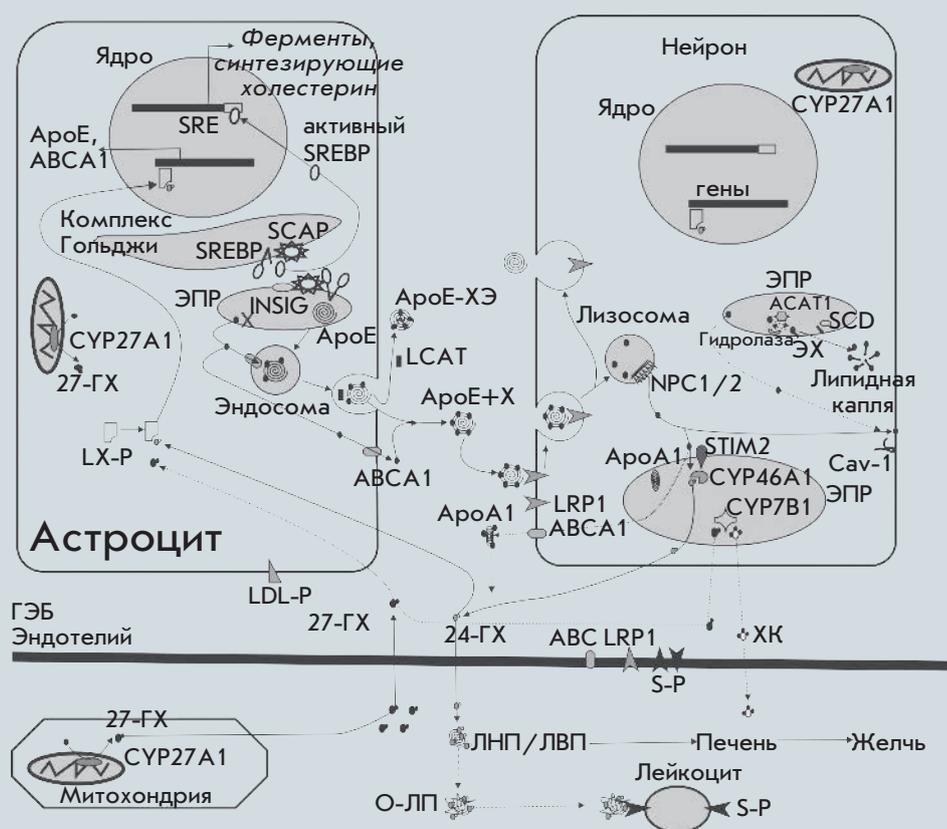


# Acta Naturae

## Метаболизм холестерина мозга и его нарушения: связь с нейродегенерацией и синаптической дисфункцией



**КЛЕТОЧНЫЕ БЕЛКИ Ku и HMGA1 КАК УЧАСТНИКИ ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1**  
СТР. 37

**МикроРНК: РОЛЬ В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ**  
СТР. 23

**АНАЛИЗ В-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА**  
СТР. 14

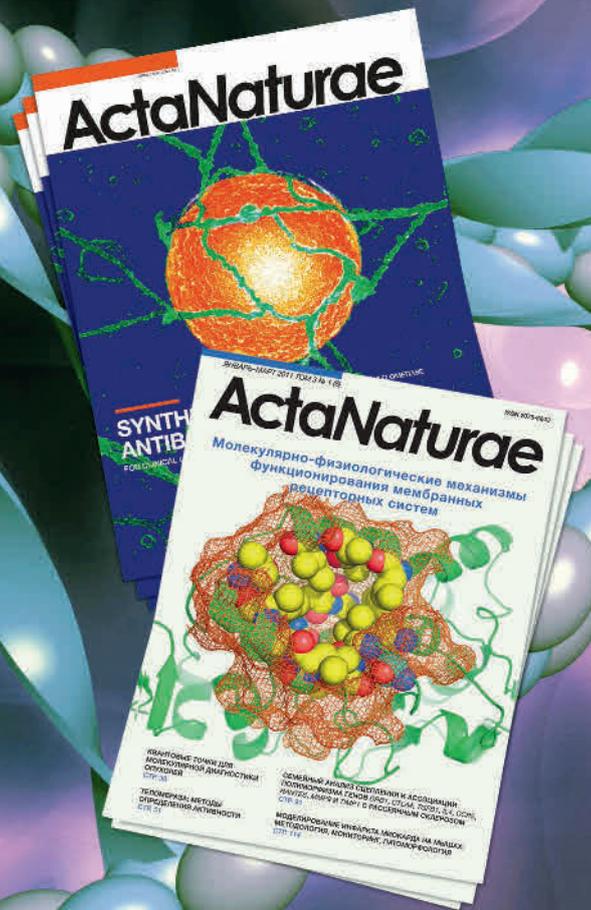
**ФАГОВЫЕ ПЕПТИДНЫЕ БИБЛИОТЕКИ КАК ИСТОЧНИК АДРЕСУЮЩИХ ЛИГАНДОВ**  
СТР. 52

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

# Acta Naturae

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](mailto:podpiska@bioif.ru)  
Web site: [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)

## ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ  
Индексы: 37283, 59881  
[www.pressa.rossp.ru](http://www.pressa.rossp.ru)

ИНФОРМНАУКА  
Индекс: 59881  
[www.informnauka.com](http://www.informnauka.com)

ИНТЕР-ПОЧТА  
Индекс: 17510  
[www.interpochta.ru](http://www.interpochta.ru)

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

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



# Письмо редакторов

**У**важаемые читатели!  
Предлагаем вашему вниманию 28-й, первый в 2016 году номер *Acta Naturae*. В этом номере мы открываем новую рубрику – «История науки» и начинаем ее публикацией материала академика Г.П. Георгиева об открытии ядерной ДНК-подобной РНК. Далее идут пять обзоров, посвященных актуальным проблемам нашей науки о живом. Все они в той или иной степени связаны с медицинскими аспектами – вирусными заболеваниями (обзоры Д.Н. Щербинина и др. и О.А. Шадринной и др.), аутоиммунными патологиями (Н.М. Баулина и др.), неврологическими проблемами (А.М. Петров и др.). Пятый обзор (А.А. Немудрая и др.) носит в значительной степени методический характер и описывает подход, уже зарекомендовавший себя как чрезвычайно перспективный

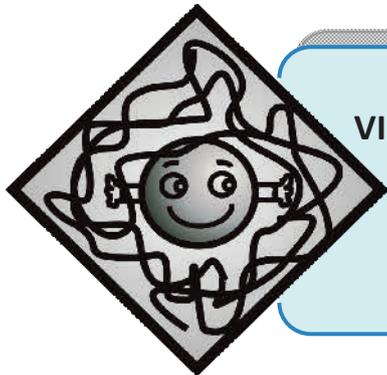
в решении проблем доставки фармакологических препаратов. Как видно из перечисленного, тематика обзоров достаточно разнообразна, и мы надеемся, что они найдут своего заинтересованного читателя.

Семь научных сообщений номера также весьма разнообразны по своей направленности – есть статьи, посвященные исследованиям взаимодействий физиологически активных веществ с различными компонентами клетки, молекулярной кардиологии, созданию новых инструментов для биологических исследований.

Ждем от вас новых интересных работ, которые мы с удовольствием будем печатать!

До новых встреч! ●

*Редколлегия*



VI ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
ШКОЛА – КОНФЕРЕНЦИЯ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНООБЪЕКТЫ И  
ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ»

**ИНЭОС**

## *Уважаемые коллеги!*

С 23 по 28 октября 2016 года в Подмосковье пройдет VI ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНООБЪЕКТЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ».

На **школе-конференции** будут представлены современные достижения в области синтеза и модификации полимерных наночастиц, способов получения полимерных нанокompозитов, исследования их структуры и свойств. Программой предусмотрены пленарные доклады ведущих российских и зарубежных ученых, активно работающих в области химии и физики наноматериалов, полимерного материаловедения, устные сообщения специалистов и аспирантов, стендовые сессии.

Ключевым событием школы-конференции являются тематические **Круглые столы**, на которых возможно более глубокое обсуждение пленарных докладов, достижений, перспектив и проблем представленных научных направлений. Традиционно молодые ученые, аспиранты и студенты имеют возможность принять непосредственное участие в дискуссиях.

В этом году будут проведены **специальная сессия** и тематический Круглый стол, посвященные вопросам организации междисциплинарного сотрудничества между научными организациями и инжиниринговыми центрами, бизнес-структурами по таким направлениям как получение полимерных наноматериалов и композитов с заданными параметрами и свойствами, инновационные технологические приемы их производства, области применения полимерных нанокompозитов. К участию в сессии приглашены ведущие специалисты научно-исследовательских институтов и научно-производственных объединений («Прометей», ВИАМ, ЦАГИ, ЦНИИСМ), а также представители бизнес-структур.

***Рады приветствовать Вас среди гостей и участников конференции!***

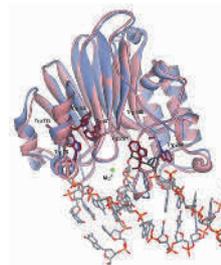
**Организаторы: ИНЭОС РАН, ИСПМ РАН, ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ РАН,  
НАУЧНЫЙ СОВЕТ РАН ПО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ**

**Дополнительная информация на сайте конференции:** <http://ineos.ac.ru/conferences/nano2016>  
или по e-mail: [nano2016@ineos.ac.ru](mailto:nano2016@ineos.ac.ru)

## Термодинамика конформационных переходов AP-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК

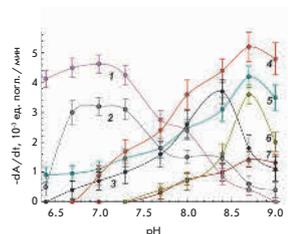
А. Д. Мирошникова, А. А. Кузнецова, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова

Получены термодинамические параметры конформационных перестроек фермента APE1 в процессе специфического узнавания поврежденного участка ДНК и осуществления каталитической стадии, которые позволили сделать вывод о молекулярной природе отдельных стадий кинетического механизма, описывающего функционирование фермента.



Сравнение структуры свободного APE1 и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт

## Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца на клетках различных микроорганизмов



Зависимость скорости лизиса клеток от pH в присутствии лизоцима

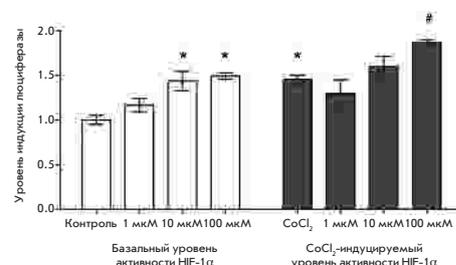
П. А. Левашов, Е. Д. Овчинникова, О. А. Морозова, Д. А. Матолыгина, Е. Э. Осипова, Т. А. Чердынцева, С. С. Савин, Г. С. Захарова, А. А. Алексева, Н. Г. Белогурова, С. А. Смирнов, В. И. Тишков, А. В. Левашов

Изучена бактериолитическая активность интерлейкина-2 и лизоцима куриного яйца в отношении 34 видов микроорганизмов. Установлено, что в присутствии интерлейкина-2 лизису подвергаются 6 видов из 3 семейств: Enterobacteriaceae, Bacillaceae и Lactobacillaceae. Выявлено также 12 видов микроорганизмов, подверженных лизису в присутствии лизоцима, и 16 видов, лизируемых додецилсульфатом натрия. Исследована pH-зависимость бактериолитической активности интерлейкина-2 и лизоцима в отношении разных клеток-субстратов.

## Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Gly-дипептида

Ю. В. Вахитова, С. В. Садовников, С. С. Борисевич, Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, С. Б. Серединин

Показана способность Ноопепта стимулировать базальную и индуцируемую миметиком гипоксии ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора HIF *in vitro*. Данные о селективном увеличении ДНК-связывающей активности HIF с учетом функциональной значимости генов, активируемых этим фактором транскрипции, объясняют выявленные ранее ноотропные и нейропротективные эффекты Ноопепта. Высказывается предположение, что HIF-позитивный эффект является первичным механизмом действия этого Pro-Gly-содержащего дипептида.



Влияние Ноопепта на базальную и индуцированную активность HIF-1

## 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. Швядас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

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

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60.  
E-mail: actanaturae@gmail.com, 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 13 марта 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](http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk)

Публикация в журнале бесплатная  
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.000

## СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов ..... 1

### ИСТОРИЯ НАУКИ

Г. П. Георгиев

Открытие ядерной ДНК-подобной РНК  
(дРНК, гяРНК) и рибонуклеопроteidных  
частиц, содержащих гяРНК ..... 6

### ОБЗОРЫ

Д. Н. Щербинин, С. В. Алексеева, М. М. Шмаров,  
Ю. А. Смирнов, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Анализ В-клеточных эпитопов  
гемагглютинаина вирусов гриппа ..... 14

Н. М. Баулина, О. Г. Кулакова, О. О. Фаворова

МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного  
воспаления ..... 23

О. А. Шадрина, Е. С. Княжанская, С. П. Королев,  
М. Б. Готтих

Клеточные белки Ku и HMG A1  
как участники транскрипции ВИЧ-1 ..... 37

А. А. Немудрая, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина  
**Фаговые пептидные библиотеки  
 как источник адресующих лигандов** ..... 52

А. М. Петров, М. Р. Касимов, А. Л. Зефиоров  
**Метаболизм холестерина мозга и его  
 нарушения: связь с нейродегенерацией  
 и синаптической дисфункцией** ..... 64

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В. Л. Андропова, М. В. Ясько, М. К. Куханова,  
 Г. А. Галегов, Ю. С. Скоблов, С. Н. Кочетков  
**Антигерпесвирусная эффективность  
 фосфита ациклогуанозина, преодолевающего  
 барьер резистентности к ацикловиру** ..... 81

Ю. В. Вахитова, С. В. Садовников, С. С. Борисевич,  
 Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин  
**Молекулярный механизм действия  
 Ноопепта — замещенного Pro-Gly-дипептида** .. 90

Е. С. Котова, С. Б. Акопов, Д. А. Дидыч,  
 Н. В. Петрова, О. В. Яровая, С. В. Разин,  
 Л. Г. Николаев  
**Связывание белкового фактора СТСФ  
 в альфа-глобиновом локусе генома кур** ..... 99

П. А. Левашов, Е. Д. Овчинникова, О. А. Морозова,  
 Д. А. Матолыгина, Е. Э. Осипова, Т. А. Чердынцева,  
 С. С. Савин, Г. С. Захарова, А. А. Алексеева,  
 Н. Г. Белогурова, С. А. Смирнов, В. И. Тишков,  
 А. В. Левашов

**Скрининг бактериолитической активности  
 интерлейкина-2 человека и лизоцима  
 куриного яйца на клетках различных  
 микроорганизмов** ..... 107

А. Д. Мирошникова, А. А. Кузнецова, Н. А. Кузнецов,  
 О. С. Федорова

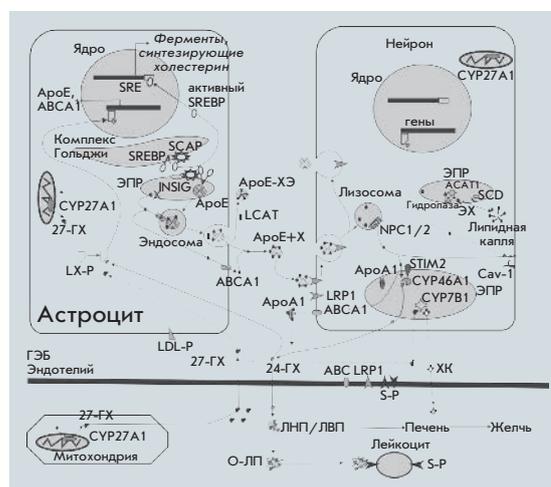
**Термодинамика конформационных переходов  
 AP-эндонуклеазы человека APE1  
 при взаимодействии с ДНК** ..... 113

Т. Р. Насибуллин, Л. Ф. Ягафарова, И. Р. Ягафаров,  
 Я. Р. Тимашева, В. В. Эрдман, И. А. Туктарова,  
 О. Е. Мустафина

**Сочетания полиморфных маркеров  
 генов белков острой фазы воспаления,  
 хемокинов и их рецепторов как потенциальные  
 предикторы ишемической болезни сердца** ... 121

В. А. Чернухин, Д. А. Гончар, М. А. Абдурашитов,  
 О. А. Беличенко, В. С. Дедков, Н. А. Михненкова,  
 Е. Н. Ломаковская, С. Г. Удальева, С. Х. Дегтярёв  
**Клонирование и характеристика новой  
 сайт-специфической метилзависимой  
 эндонуклеазы EImI, узнающей и расщепляющей  
 C5-метилированную последовательность  
 ДНК 5'-G(5mC)^NG(5mC)-3'** ..... 127

**Правила для авторов** ..... 137



### РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Метаболизм холестерина в мозге. (См. статью Петрова и др.)

УДК 577

# Открытие ядерной ДНК-подобной РНК (дРНК, гяРНК) и рибонуклеопротеидных частиц, содержащих гяРНК

Г. П. Георгиев

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

С 9 по 11 августа 2014 г. проводился специальный симпозиум в Колд Спринг Харборе (США), посвященный открытию матричной, или информационной, РНК и основным тенденциям в дальнейшем изучении ее синтеза, регуляции синтеза, созревания и транспорта. Существование мРНК у бактерий на основании генетических исследований предположили в 1961 г. Жакоб и Моно [1], и в том же году Бреннер и соавт. подтвердили это предположение [2]. Наша лаборатория сыграла ключевую роль в открытии информационной РНК у эукариот, а также содержащих ее ядерных рибонуклеопротеидов с расшифровкой их структурной организации. Поэтому я был приглашен на симпозиум от России, и перечисленным вопросам должен был быть посвящен мой доклад. Однако виза была выдана уже после окончания симпозиума, и доклад был зачитан моим бывшим сотрудником Г.Н. Ениколоповым, работающим в лаборатории Колд Спринг Харбора. Ниже приведен перевод этого доклада на русский язык.

## ОТКРЫТИЕ ЯДЕРНОЙ дРНК

Работы, о которых пойдет речь, были начаты моей группой в лаборатории И.Б. Збарского в Институте морфологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР. Основная же их часть была выполнена в Институте молекулярной биологии АН СССР, куда в качестве заведующего лабораторией меня пригласил его директор В.А. Энгельгардт, чьим именем позднее был назван этот институт.

Моим основным сотрудником в открытии ядерной дРНК была В.Л. Мантьева, позднее кандидат биологических наук. Нас интересовала природа ядерной РНК [3]. Для выделения РНК использовали недавно разработанный фенольный метод [4]. Суспензию клеток асцитного рака Эрлиха

мышей в 0.14 М NaCl встряхивали с фенолом, рН 6.0, на холоду, а затем центрифугировали смесь. Неожиданно мы обнаружили, что промежуточный слой, образующийся после центрифугирования между водной и фенольной фазами, состоит из сохранивших свою форму клеточных ядер [5]. Эти ядра содержали хроматин и ядрышки, в которых сохраняются ДНК, ядерная РНК и большая часть ядерных белков (рис. 1). Поскольку фенол подавляет активность ферментов, мы предположили, что «фенольные» ядра могут служить хорошим материалом для приготовления ядерной РНК. В дальнейшем оказалось, что ядерную РНК из «фенольных» ядер можно извлечь с помощью той же про-



Директор Института молекулярной биологии АН СССР В.А. Энгельгардт с автором

цедуры, но осуществляя встряхивание при температуре 65°C [3]. Выделенная ядерная РНК содержала в своем составе компоненты с коэффициентом седиментации 28S и 18S, характерные для рибосомной РНК, и гетерогенный материал. Нуклеотидный

состав ядерной РНК был промежуточным между ДНК мыши ( $G+C/A+T = 0.72$ ) и рибосомной РНК ( $G+C/A+T = 1.65$ ) (рис. 1). Мы предположили, что ядерная РНК представлена рибосомной РНК и новым типом РНК, нуклеотидный состав которой сходен с составом ДНК, т.е. информационной РНК. Первые же опыты по фракционированию ядерной РНК, выполненные в 1961 г., подтвердили это предположение [3].

Наилучшее разделение дал разработанный в 1962 г. метод термического фенольного фракционирования, т.е. обработки фенольных ядер смесью 0.14 М NaCl–фенол, pH 6.0, при ступенчато повышающейся температуре [6]. При 40°C в водную фазу переходила чистая РНК с нуклеотидным составом, соответствующим рибосомной РНК (рРНК), которая содержала предшественники рибосомной РНК. В температурном интервале 55–65°C в водной фазе обнаруживалась чистая РНК, имеющая нуклеотидный состав, сходный с составом ДНК ( $G+C/A+U = 0.7-0.74$ ). Существенно, что нуклеотидный состав тотальной РНК выделенной фракции и присутствующей в ее составе новообразованной РНК, определяемый по меченой радиоактивным фосфором РНК, полностью совпадал [7, 8] (таблица). Открытая и очищенная ДНК-подобная РНК была названа дРНК. Описавшие эту РНК тремя годами позднее (в 1965 г.) американские авторы обозначили ее термином гетерогенная ядерная РНК (hnRNA, или гяРНК) [9–12].

Далее мы охарактеризовали ядерную дРНК. Она оказалась весьма гетерогенной по молекулярному весу, который достигал очень высокого уровня. Новообразованная ядерная дРНК имела значительно более высокий молекулярный вес, чем тотальная ядерная дРНК, что предполагало

Выделение ядерной дРНК методом фенольного термического фракционирования

Фракции РНК (ДНК)	G	C	A	U(T)	$G+C / A+U(T)$
ДНК мыши	21	21	29	29	0.72
Цитоплазматическая, 4°C	32	30	20	18	1.63
Ядерная, 4–40°C	32	29	20	19	1.50
Ядерная, 55–65°C, тотальная	23	20	28	29	0.76
Новообразованная ядерная, 55–65°C	21	20	29	30	0.71

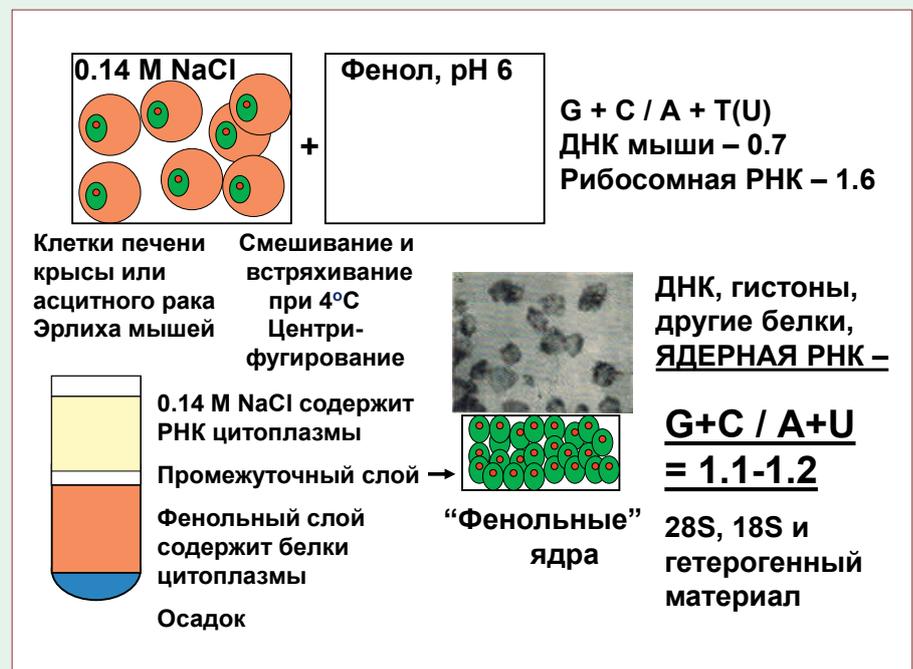


Рис. 1. Получение и свойства «фенольных» клеточных ядер. Слева – схема получения клеточных ядер путем обработки фенолом. Приведена фотография «фенольных» ядер из клеток асцитного рака Эрлиха. Справа – состав полученных ядер и свойства их РНК: нуклеотидный состав, промежуточный между ДНК и рРНК, и данные ультрацентрифугирования

ее расщепление в клеточном ядре (процессинг) [7, 8] (рис. 2).

В то же время мы определили размеры дРНК цитоплазмы, предположительно, зрелой мРНК. Для этого был разработан метод частичного блока синтеза РНК актиномицином Д, малые дозы которого избирательно подавля-

ют синтез рРНК, не затрагивая синтез дРНК. Молекулярный вес новообразованной дРНК ядра существенно превышал таковой у дРНК цитоплазмы [7, 8] (рис. 2).

Наконец, были проведены опыты по гибридизации и конкуренции ядерной дРНК и цитоплазматической мРНК с ДНК.

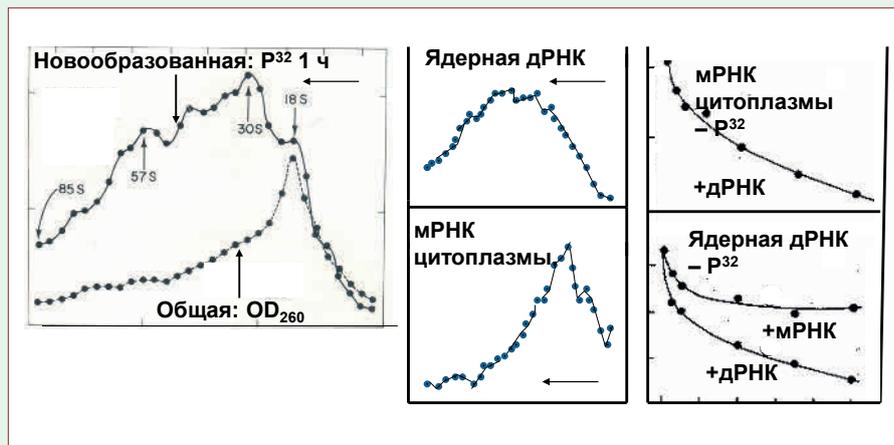
Добавление ядерной дРНК полностью подавляло гибридизацию мРНК с ДНК, тогда как избыток мРНК лишь частично снижал гибридизацию ядерной дРНК с ДНК (рис. 2).

Мы предположили, что ядерная дРНК является высокомолекулярным предшественником цитоплазматической мРНК, или про-мРНК, которая частично разрушается в ходе процессинга дРНК и созревания мРНК, что происходит в клеточном ядре, откуда мРНК экспортируется в цитоплазму. Окончательное доказательство этого потребовало нескольких лет и усилий ряда лабораторий. Однако первое доказательство существования информационной РНК у эукариот было получено в описанных работах [6–8].

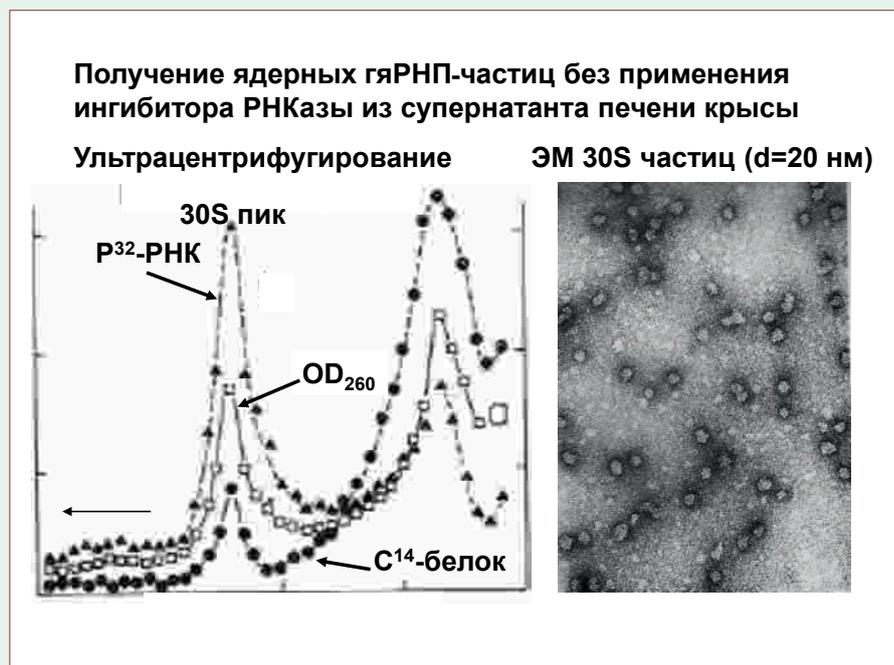
**ОТКРЫТИЕ  
РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ (РНП)  
ЧАСТИЦ: дРНП (гяРНП)**

Следующим шагом стало изучение состояния ядерной дРНК в клеточном ядре. Моим главным соавтором в этом цикле работ была О.П. Самарина, позднее доктор биологических наук, профессор, лауреат Ленинской премии.

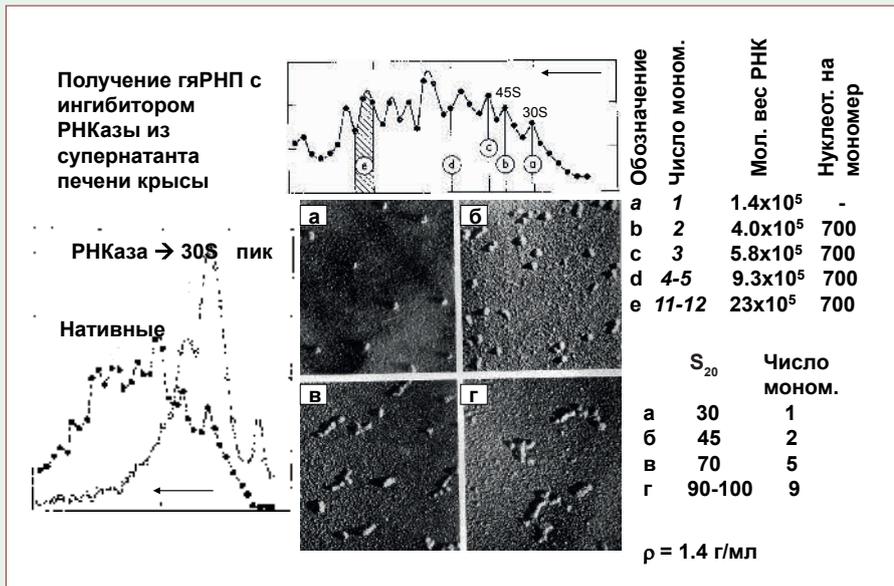
Для изучения структур, содержащих гяРНП, использовали мягкую процедуру. Ядра печени крысы экстрагировали 0.14 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-буфером, рН 7.0. Некоторая часть РНК переходила в экстракт, и ее нуклеотидный состав был промежуточным между рРНК и дРНК. Зато последующая трехкратная экстракция тем же раствором, но при рН 7.8–8.0 переводила в раствор значительно большую часть РНК, причем эта РНК имела нуклеотидный состав такой же, как у чистой дРНК. ДНК-подобный состав был характерен и для тотальной, и для новообразованной РНК экстракта [13].



**Рис. 2.** Характеристика ядерной дРНК. Слева – ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы ядерной дРНК, меченой в течение 1 ч P<sup>32</sup>. Видно, что молекулярный вес меченой дРНК существенно выше, чем у тотальной дРНК, определяемой по оптической плотности. Здесь и далее тонкие стрелки указывают направление ультрацентрифугирования. В центре – сравнение молекулярных весов меченой в течение 1 ч ядерной дРНК и меченой в течение того же времени мРНК цитоплазмы. Первая имеет значительно больший молекулярный вес. Справа – гибридизация меченой мРНК цитоплазмы и ядерной дРНК в конкуренции с немеченой ядерной дРНК и цитоплазматической мРНК



**Рис. 3.** Свойства ядерных гяРНП-частиц, полученных на первом этапе работы. Слева: ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте ядерных экстрактов, содержащих гяРНП. РНК метили P<sup>32</sup>-ортофосфатом, белок смесью C<sup>14</sup>-аминокислот. Справа – электронная микроскопия 30S частиц из сахарозного градиента



**Рис. 4.** Свойства ядерных гЯРНП-поличастиц. Слева – распределение при ультрацентрифугировании гЯРНП, полученных при подавлении РНКазы. Превращение поличастиц в 30S мономеры при мягкой обработке РНКазой. Справа сверху – поличастицы, молекулярный вес РНК, выделенной из частиц с разным числом мономеров, и число нуклеотидов, приходящихся на один мономер. Внизу справа – ЭМ (напыление) частиц из разных областей градиента, коэффициенты седиментации и число мономеров. Плавающая плотность одинакова для всех частиц (1.4)

При ультрацентрифугировании большая часть гЯРНК обнаруживалась в гомогенном 30S пике, содержащем частицы с диаметром около 20 нм. Молекулярный вес РНК, выделенной из 30S пика, был незначительным (рис. 3). Это противоречило данным о весьма высоком молекулярном весе гЯРНК, выделенной фенольным фракционированием. Чтобы разрешить это противоречие, мы провели выделение экстрактов в присутствии ингибитора РНКаз из супернатанта цитоплазмы печени крысы. Совершенно иной была картина ультрацентрифугирования таких экстрактов: выявлена целая серия пиков, начиная с небольшого 30S пика и кончая материалом с коэффициентом седиментации 200S и выше (рис. 4). Очевидно, что такая ситуация была много ближе к нативной [14].

Интересно, что и 30S пик, и все более тяжелые пики имели одинаковую плавающую плотность в CsCl (после фиксации формальдегидом), равную примерно 1.4 г/мл, что соответствует отношению РНК/белок порядка 1 : 4–1 : 5.

Далее мы охарактеризовали крупные частицы. Мягкая обработка рибонуклеазой А количественно превращала их в 30S частицы диаметром 20 нм, которые являются, таким образом, мономером поличастиц. Действительно, электронная микроскопия с напылением показала, что 30S частицы представляют собой мономеры, 45S частицы – димеры, 70S частицы – пентамеры, а 90–100S пик содержит поличастицы, состоящие из 9 мономеров. Определение размеров РНК, выделенной из разных пиков, показало,

что во всех случаях на мономер приходится отрезок РНК длиной примерно 700 нуклеотидов. Это согласуется с тем, что плавающая плотность всех пиков гЯРНП одинакова (рис. 4).

Таким образом, гЯРНП представляют собой цепи сходных РНП-частиц, соединенных мостиками РНК, которые наиболее чувствительны к обработке рибонуклеазой [15].

Чтобы лучше понять структуру гЯРНП-частиц, мы изучили структуру 30S мономера. Интенсивная обработка рибонуклеазой полностью разрушает РНК 30S частиц, что предполагает ее поверхностную локализацию. Далее белки 30S частиц метили  $I^{125}$  и обрабатывали 30S частицы 2 М NaCl, который вызывает диссоциацию РНК и белка. При ультрацентрифугировании вся гЯРНК оставалась в верхних фракциях, тогда как белок открывался в том же 30S пике, несмотря на удаление РНК. Плавающая плотность 30S частиц соответственно падала до 1.34 г/см<sup>3</sup> [1–6] (рис. 5).

При смешивании белковых частиц с гЯРНК и удалении диализом 2 М NaCl происходит реконструкция гЯРНП-частиц, не отличимых от исходных по целому ряду тестов. При электронной микроскопии исходные 30S частицы, белковые частицы и реконструированные гЯРНП выглядят одинаково (рис. 5). При реконструкции в присутствии гЯРНК размером около 1.4 тыс. нуклеотидов образуются димерные гЯРНП [15]. Белковые 30S частицы были названы информоферами (носители информационной РНК), но этот термин в литературе не удержался.

Информоферы представляют собой белковые комплексы, содержащие примерно 20 белков с молекулярным весом около 40 кДа, относящихся, по данным других авторов, к шести разным типам

[16]. Был сделан вывод, что ядерные гяРНП – это длинные гяРНК, регулярно намотанные на поверхность серии похожих или одинаковых белковых глобулярных частиц. Подобная структура приводит к сильной компактизации длинных гяРНК, в то же время оставляя ее доступной для взаимодействия с более специфичными факторами, участвующими в процессинге и экспорте РНК.

Интересно, что сходный принцип организации позднее обнаружили и в нуклеосомах хроматина [17].

**ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ мРНК В ИНСТИТУТЕ БИОЛОГИИ ГЕНА РАН**

Автор статьи далее переключился на другие проблемы, связанные с организацией генома (открытие и характеристика мобильных генетических элементов в клетках животных) и хроматина. Однако изучение регуляции синтеза гяРНК и экспорта мРНК активно развивается в организованном 25 лет назад Институте биологии гена РАН, где является основным направлением. Другое важное направление, разрабатываемое в Институте, – новые подходы к терапии рака. В этом направлении сейчас участвует автор. Ниже кратко указаны некоторые ключевые исследования, связанные с мРНК.

Прежде всего, были открыты новые свойства инсуляторов, важных *цис*-элементов в регуляции транскрипции. Оказалось, что их функционирование во многом зависит от способности одинаковых инсуляторов прочно связываться между собой [18, 19]. Это их свойство определяется димеризацией ряда белков, входящих в состав инсуляторных комплексов, например, белка Mod(mdg4), открытого в Институте [20] (рис. 6).

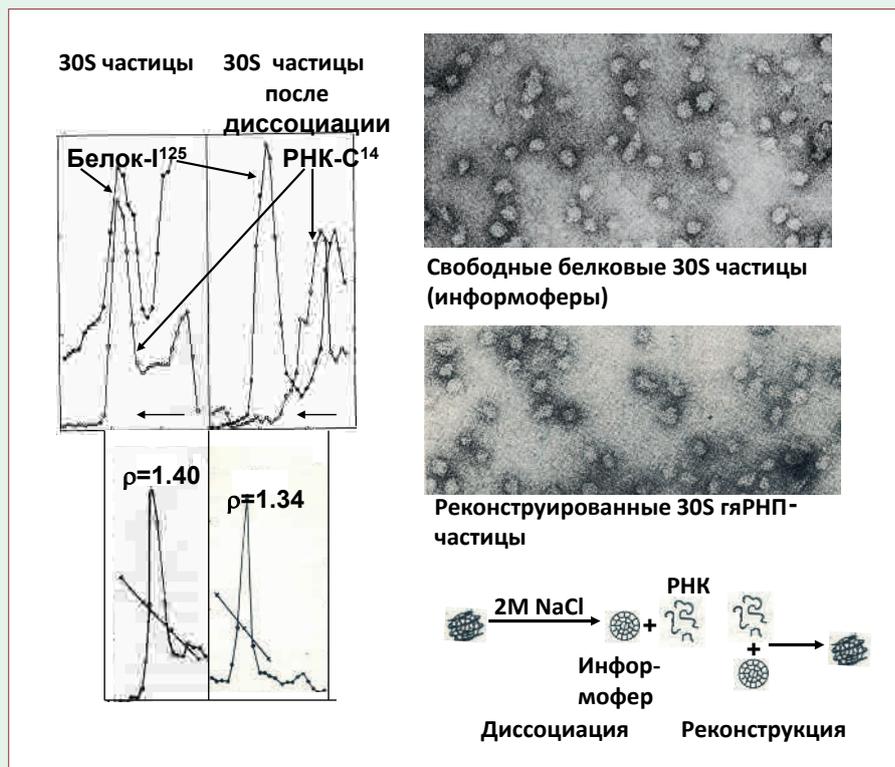


Рис. 5. Структура гяРНП-частиц. Справа 30S частицы, меченные по РНК и белку (последний с помощью I<sup>125</sup>) до и после обработки 2 М NaCl. В отличие от исходных, частицы, обработанные 2 М NaCl, теряют всю РНК, хотя их коэффициент седиментации и размеры при ЭМ остаются неизменными. Плавучая плотность при этом снижается с 1.4 до 1.34 г/мл. Слева – ЭМ диссоциированных и реконструированных 30S частиц. Внизу – схема диссоциации и реконструкции гяРНП

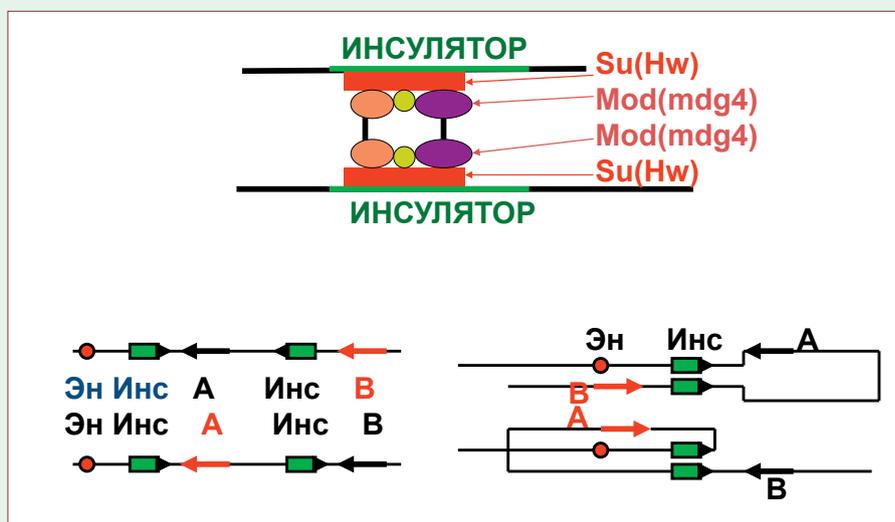


Рис. 6. Взаимодействие инсуляторов. Благодаря наличию серии белков в инсуляторном белковом комплексе образуется несколько контактов, что определяет прочное связывание одноименных инсуляторов и полярность их взаимодействия. Связываются лишь однонаправленные инсуляторы, что определяет конфигурацию петли и активацию того или иного гена



Рис. 7. Сверхдальние взаимодействия в геноме. Они определяются взаимодействием инсуляторов и могут вести к активации промотора энхансером. Удаление двух или одного любого инсулятора разрушает это взаимодействие

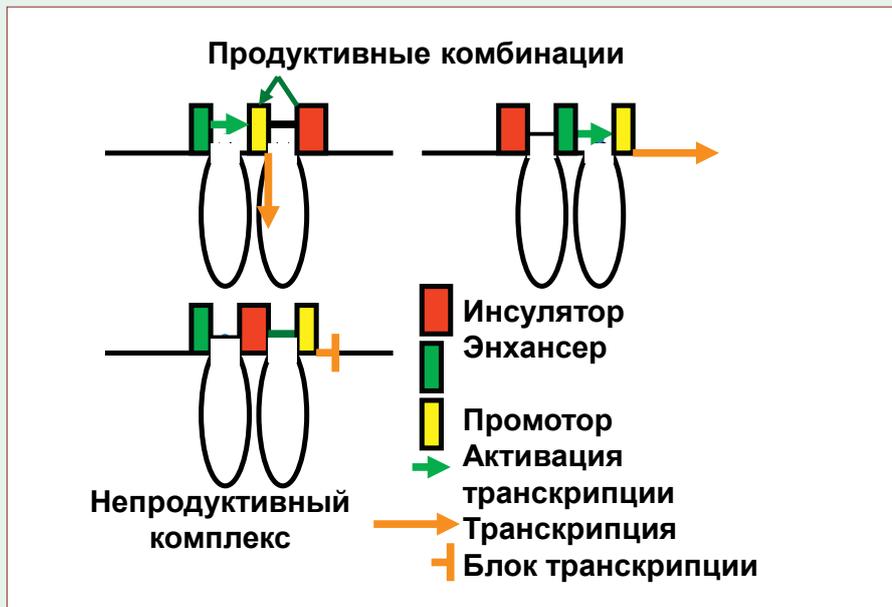


Рис. 8. Взаимодействие инсуляторов с другими элементами. Инсуляторы взаимодействуют с промоторами, активируя их, и с энхансерами (более избирательно). Оказавшись между ними, инсулятор, если вблизи нет другого инсулятора, может взаимодействовать с обоими, образуя непродуктивный комплекс



Рис. 9. Схема образования суперкомплекса белком SAYP. Благодаря образованию суперкомплекса резко повышается эффективность связывания TFIID с промотором и активность транскрипции

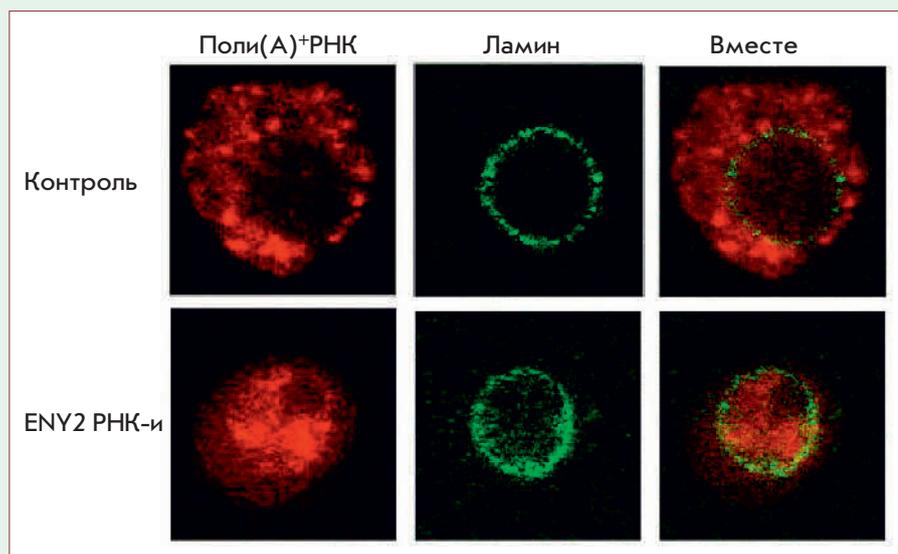
В отличие от энхансеров, инсуляторы обладают полярностью: они взаимодействуют, только находясь в одинаковой ориентации. Поэтому в зависимости от ориентации инсуляторов в геноме конфигурации петель ДНК, образуемых в результате их взаимодействия, различаются, что, в свою очередь, определяет, какой ген будет активирован [21, 22] (рис. 6).

Были открыты сверхдальние взаимодействия в геноме [23, 24]. Они достигают десятков миллионов пар нуклеотидов и могут происходить даже между негомологичными хромосомами. Они зависят от взаимодействия между инсуляторами и могут вести к активации промотора энхансером. Вырезание одного из инсуляторов ведет к полной утрате сверхдального взаимодействия, что отражается в инактивации зависящей от него транскрипции (рис. 7).

Наконец, было установлено, что инсуляторы способны взаимодействовать с промоторами (с низкой избирательностью), активируя их, и с энхансерами (более избирательно). Поэтому инсулятор, расположенный между энхансером и промотором, может взаимодействовать с обоими, образуя непродуктивный комплекс. Это может объяснять хорошо известное разобщающее действие инсулятора [25, 26] (рис. 8).

Были открыты два новых белка, играющих важную роль в контроле транскрипции гяРНК и последующих этапах формирования и экспорта мРНК, E(y)2/ENY2 и SAYP [27, 28].

SAYP связывает белковый иницирующий комплекс TFIID и ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF в единый суперкомплекс. Нокдаун SAYP блокирует рекрутирование TFIID и SWI/SNF на промоторе и подавляет транскрипцию



**Рис. 10.** Нокдаун белка ENY2 приводит к блоку экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Подавление образования белка достигается с помощью РНК-интерференции. В результате почти вся поли(А)<sup>+</sup>РНК остается в ядре

многих генов. Можно предположить, что объединение комплексов позволяет TFIID, как только вызванное SWI/SNF движение нуклеосом вдоль ДНК приведет к освобождению промотора от ну-

клеосом, сразу с ним связаться [29] (рис. 9).

Было установлено, что E(y)2/ENY2 является многофункциональным белком. Он входит в состав комплекса SAGA, его

модуля DUB, участвуя в активации инициации транскрипции [30]. ENY2 также входит в белковый комплекс ТНО, участвующий в элонгации гЯРНК, связывающийся с гЯРНК и вовлеченный в экспорт ряда мРНК. ENY2 – важный компонент белкового комплекса АМЕХ дрозофилы, связывающийся с гЯРНК и играющий ключевую роль в экспорте многих мРНК. Нокдаун ENY2 с помощью РНК-интерференции ведет к полному блоку транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Вся мРНК задерживается в ядре [31] (рис. 10). Наконец, ENY2 входит в состав некоторых инсуляторных комплексов, выполняя при этом барьерную функцию инсулятора [32].

Это только часть работ Института по контролю синтеза и экспорта мРНК.

Таким образом, ранние работы по выявлению информационной РНК у эукариот продолжают успешно развиваться.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jacob F., Monod J. // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 318–356.
- Brenner S., Jacob F., Meselson M. // Nature. 1961. V. 190. P. 576–581.
- Георгиев Г.П. // Биохимия. 1961. Т. 26. С. 1095–1126.
- Kirby K.S. // Biochem. J. 1956. V. 64. P. 405–408.
- Георгиев Г.П., Мانتьева В.Л. // Биохимия. 1960. Т. 25. С. 143–150.
- Georgiev G.P., Mantieva V.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 61. P. 153–154.
- Georgiev G.P., Samarina O.P., Lerman M.I., Smirnov M.N. // Nature. 1963. V. 200. P. 1291–1294.
- Самарина О.П., Лерман М.И., Туманян В.Г., Ананьева Л.Н., Георгиев Г.П. // Биохимия. 1965. Т. 30. С. 880–893.
- Scherrer K., Marcaud L., Zajdela F., London I.M., Gros F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966. V. 56. P. 1571–1578.
- Warner J.R., Soeiro R., Birnboim H.C., Girard M., Darnell J.E. // J. Mol. Biol. 1966. V. 19. P. 349–356.
- Penman S. // J. Mol. Biol. 1966. V. 17. P. 117–130.
- Houssais J.F., Attardi G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966. V. 56. P. 616–623.
- Samarina O.P., Krichevskaya A.A., Georgiev G.P. // Nature. 1966. V. 210. P. 1319–1322.
- Samarina O.P., Lukanidin E.M., Molnar J., Georgiev G.P. // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 251–263.
- Lukanidin E.M., Zalmanzon E.S., Komaromi L., Samarina O.P., Georgiev G.P. // Nat. New Biol. 1972. V. 238. P. 193–197.
- Dreyfus G., Matenis M.J., Pino-Roma S., Burd C.G. // Ann. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 289–321.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. // Nature. 1997. V. 389. P. 251–260.
- Gause M., Hovhannisyann H., Kan T., Kuhfittig S., Mogila V., Georgiev P. // Genetics. 1998. V. 149. P. 1393–1405.
- Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E., Parshikov A., Belenkaya T., Pirrotta V., Georgiev P. // Science. 2001. V. 291. P. 495–498.
- Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. // J. Mol. Biol. 2011. V. 412. P. 423–436.
- Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. P. 7019–7028.
- Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 3042–3052.
- Kyrchanova O., Georgiev P. // FEBS Lett. 2014. V. 588. P. 8–14.
- Kravchenko E., Savitskaya E., Kravchuk O., Parshikov A., Georgiev P., Savitsky M. // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. P. 9283–9291.
- Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // Development. 2011. V. 138. P. 4097–4106.
- Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // PLoSGenet. 2013. V. 9. e1003606.

27. Shidlovskii Y.V., Krasnov A.N., Nikolenko J.V., Lebedeva L.A., Kopantseva M., Ermolaeva M.A., Ilyin Y.V., Nabirochkina E.N., Georgiev P.G., Georgieva S.G. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 97–107.
28. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., Eickhoff H., Becker P., Tora L., Georgiev P., Soldatov A. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 5223–5231.
29. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., Kuzmina J.L., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 11049–11054.
30. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 4956–4965.
31. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. P. 86–96.
32. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // *Mol. Cell.* 2007. V. 27. P. 332–338.

УДК 578.74

# Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютинаина вирусов гриппа

Д. Н. Щербинин\*, С. В. Алексеева, М. М. Шмаров, Ю. А. Смирнов, Б. С. Народицкий,  
А. Л. Гинцбург

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*E-mail: dim284@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.08.2015

Принята к печати 09.12.2015

**РЕФЕРАТ** Вакцинация давно и успешно применяется для профилактики гриппа. Основным антигеном современных гриппозных вакцин является гемагглютинин (НА) вируса гриппа, вызывающий гуморальный иммунный ответ в организме человека и защищающий от гриппа. Однако периодически появляются новые сезонные и пандемические варианты вируса с измененной структурой НА. Это позволяет возбудителю избежать нейтрализации антителами, которые образовались в ответ на ранее проведенную вакцинацию. Разработка вакцины с новыми вариантами НА в качестве антигена занимает продолжительное время, поэтому в период эпидемии важно иметь в качестве профилактики и терапии средства для пассивной иммунизации, которыми могут служить моноклональные или однодоменные антитела с универсальной специфичностью (широкого спектра действия). В качестве универсальных антител рассматривают антитела к консервативным эпитопам антигенов вируса гриппа. Мы попытались охарактеризовать основные В-клеточные эпитопы гемагглютинаина и обобщить собственные и опубликованные данные об антителах с широкой нейтрализующей активностью. С использованием различных баз данных проведен компьютерный анализ наиболее известных конформационных эпитопов НА вирусов гриппа. Результаты анализа свидетельствуют, что мишенью поиска и создания антител широкого спектра действия к вирусу гриппа может быть стержневая часть молекулы НА, антитела к которой обладают выраженной гетеросубтипической активностью.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа, гемагглютинин, конформационные эпитопы, моноклональные антитела широкого спектра действия, однодоменные антитела широкого спектра действия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** НА – гемагглютинин вируса гриппа; Н1–Н18 – подтипы гемагглютинаина вируса гриппа.

## ВВЕДЕНИЕ

Гемагглютинин (НА) – основной антигенный компонент вирусов гриппа, представляет собой гомотримерный поверхностный гликопротеин с грибоподобной формой, мономер которого состоит из двух фрагментов, связанных дисульфидным мостиком: НА1 (330 аминокислот) – глобулярная часть, дистальная от вирусной мембраны, и НА2 (220 аминокислот) – стержневая часть, закрепленная в вирусной мембране. В природе найдено 18 подтипов НА вирусов гриппа А [1].

Вируснейтрализующие антитела, индуцированные НА, составляют основу гуморального иммунитета, защищающего организм человека от гриппозной инфекции [2]. Антигенная структура НА постоянно изменяется в результате селективного давления иммунной системы организма-хозяина,

что приводит к появлению и селекции новых вариантов вируса, способных избегать нейтрализующего эффекта существующих антител и преодолевать специфическую иммунную защиту человека. Этот механизм – антигенный дрейф – снижает эффект противогриппозной вакцинации [3]. При появлении пандемических штаммов вируса гриппа А, когда вирус с новым антигенным подтипом НА попадает в человеческую популяцию (антигенный шифт) [2, 4], существующие вакцины оказываются неэффективными. Эти обстоятельства объясняют необходимость поиска новых подходов к созданию противогриппозных препаратов с широким спектром активности [5]. Один из таких подходов – поиск и характеристика консервативных антигенных детерминант в молекуле НА вируса гриппа, получение нейтрализующих антител широкого спектра действия. Такие антите-

ла могут использоваться для экстренной пассивной иммунизации или терапии при проведении противоэпидемических мероприятий.

Молекулярные исследования антигенной структуры HA показали, что участки, взаимодействующие с антителами, расположены главным образом в глобулярном домене субъединицы HA1 [6]. Аминокислотные последовательности данных сайтов чрезвычайно вариабельны и различаются не только у разных подтипов HA, но и внутри одного подтипа. В субъединице HA2 обнаружены консервативные детерминанты [7–10]. Эти данные позволили предположить, что консервативные антигенные сайты в молекуле HA могут индуцировать образование антител с широкой перекрестно нейтрализующей активностью. Это предположение подтверждено Y. Okuno и соавт. [11], которые впервые получили и охарактеризовали моноклональное антитело к HA подтипа H2, обладающее нейтрализующей активностью в отношении штаммов вирусов гриппа А с HA H2 и H1. Это моноклональное антитело (С179) распознает конформационный эпитоп в стержневом регионе молекулы HA, консервативный у вирусов гриппа А подтипов H2 и H1. Известно, что вирусы гриппа птиц подтипов H5 и H6 филогенетически близки к штаммам подтипов H1 и H2 [12, 13]. Широкий спектр действия мышиного антитела С179 выявлен в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского и показано, что это антитело реагирует с вирусами подтипов H1, H2 и H5 (и даже с HA подтипа H6 в его не вполне зрелой форме) [14, 15].

В качестве многообещающего средства пассивной иммунизации против гриппа рассматривают однодоменные антитела. Однодоменные антитела малы, стабильны и просты в производстве. Показано, что интраназальное введение полученных от ламы одноцепочечных фрагментов вариабельных доменов иммуноглобулинов, обладающих нейтрализующей активностью *in vitro* против вирусов гриппа H5N1, могут контролировать репликацию вируса, а также снижать заболеваемость и смертность мышшей, зараженных вирусом гриппа H5N1. Хотя исследование было сосредоточено на однодоменных антителах, которые распознают эпитоп около домена связывания с рецептором, подчеркивается принципиальная возможность отбора молекул антител широкого спектра действия, которые связываются с другими эпитопами HA, в том числе консервативными [16].

В другой работе получено однодоменное антитело к HA вируса гриппа А и сконструирован рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий данное антитело. Введение такого рекомбинантного аденовируса в интервале от 48 ч до 14 дней до заражения способно полностью защищать мышшей от вируса гриппа А [17].

Таким образом, совершенно очевидна необходимость поиска средств пассивной иммунизации с универсальной специфичностью, которые позволяют преодолеть антигенную изменчивость вируса гриппа [18].

Возможно, что направление поиска путей пассивной иммунизации, обеспечивающей защиту от широкого спектра вирусов гриппа, начатое совместно японскими и российскими учеными и продолжаемое сейчас в ряде лабораторий, окажется наиболее перспективным.

### АНТИТЕЛА К ГЛОБУЛЯРНОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ НА

Наибольшее количество вируснейтрализующих антител, вырабатываемых естественным или искусственным путем, связывается с глобулярной частью HA, что приводит к блокированию прикрепления вирионов к клеткам. Однако вследствие того, что ген HA быстро мутирует, возникают аминокислотные замены, которые приводят к формированию новых сайтов гликозилирования, что, в свою очередь, вызывает изменения поверхностной структуры белка. Следовательно, эти антигенные сайты высоковариабельны и антитела к ним штаммоспецифичны. Отчасти это объясняет, почему иммунитет после натурального заражения или вакцинации в основном ограничивается циркулирующим штаммом. Например, антитела 2D1, связывающие Sa-антигенный сайт, расположенный в глобулярной части молекулы HA, распознают только пандемические вирусы H1N1 1918 и 2009 годов, эпитопы которых являются антигенно подобными, хотя их разделяет почти столетие [19]. Другие штаммы подтипа H1, например PR8, такие антитела не способны распознавать (табл. 1, рисунок).

Однако за последнее время были описаны и охарактеризованы несколько антител, специфичных к глобулярной части HA и обладающих при этом вируснейтрализующей активностью против нескольких штаммов вируса гриппа в пределах одного подтипа. Эти эпитопы консервативны у различных штаммов вирусов и, следовательно, распознаются одним и тем же антителом. Примечательно, что эпитопы таких антител могут располагаться в различных антигенных сайтах. Например, антитела H5M9 взаимодействуют с консервативным эпитопом HA подтипа H5, который локализуется в рудиментарном эстеразном субдомине поблизости от рецепторсвязывающего сайта и частично перекрывает антигенный сайт Сb [20]. Антитела H5M9 эффективно защищают мышшей от летальных доз различных штаммов подтипа H5. Антитела HC45 и VH151 также взаимодействуют с подобным антигенным сайтом (рисунок), однако их способность взаимодействовать с раз-

Таблица 1. Известные антитела к В-клеточным эпитопам HA вирусом гриппа А и В

Антигенный сайт	Антитело	PDB ID	Источник антител	Подтип антител	Источник антигена	Ссылка
Р.с.к.	CH65, CH67	3SM5	H. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[27, 33]
Р.с.к.	CH65	3SM5	H. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[27]
Р.с.к.	CH67	4HKX	H. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[33]
Sa-сайт	2D1	3LZF	H. s.	?	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[19]
Р.с.к.	1F1	4GXU	H. s.	?	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[28]
	GC0757	4F15	M. m.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[45]
	GC0587	4LVH	M. m.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[23]
Р.с.к.	5J8	4M5Z	H. s.	?	A/California/07/2009(H1N1)	[26]
Р.э.с.	H5M9	4MHH	M. m.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1)	[20]
	H5M9	4MHJ			A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1)	[20]
Р.с.к.	8F8	4HF5	H. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.с.к.	8M2	4HFU	H. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.с.к.	2G1	4HG4	H. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.э.с.	BH151	1EO8	M. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[22]
Р.э.с.	HC45	1QFU	M. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[21]
Р.с.к.	C05	4FP8 4FQR	H. s.	?	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[30]
Р.с.к.	S139/1	4GMS	M. m.	IgG2a	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[31]
Р.с.к.	F045-092	4O58	H. s.	?	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[32]
Р.с.к.	F045-092	4O5I	H. s.	?	A/Singapore/H2011.447/2011(H3N2)	[32]
Р.с.к.	HC63	1KEN	M. m.	?	A/X-31(H3N2)	[46]
Р.с.к.	HC19	2VIR 2VIS 2VIT	M. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[47]
	IIB4		M. m.	?	A/Philippines/2/1982(H3N2)	[48]
	Fab 26/9	1FRG	M. m.	IgG2a	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[49]
	CR8071	4FQJ	H. s.	IgG1	B/Florida/4/2006	[44]
	CR8059	4FQK	H. s.	IgG1	B/Brisbane/60/2008	[44]
С.т.	FI6v3	3ZTJ	H. s.	?	A/Aichi/2/1968(H3N2)	[42]
	FI6v3	3ZTN	H. s.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[42]
	MAb 3.1	4PY8	H. s.	IgG1	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[39]
	CR6261	3GBN	M. m.	IgG1	A/Brevig Mission/1/1918(H1N1)	[37, 50]
	CR6261	3GBM	M. m.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[37]
	CR8020	3SDY	H. s.	?	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[40]
	F10	3FKU	H. s.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[38]
	C179	4HLZ	M. m.	IgG2a	A/Japan/305/1957(H2N2)	[11, 15, 36]
	CR8043	4NM8	H. s.	IgG1	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[41]
	CR9114	4FQI	H. s.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[44]
	CR9114	4FQV	-/-/-/-	-/-/-/-	A/Netherlands/219/2003(H7N7)	[44]
	CR9114	4FQY	-/-/-/-	-/-/-/-	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[44]
		Fab 39.29	4KVN	H. s.	?	A/Perth/16/2009(H3N2)

Примечания. Информация о наиболее известных конформационных В-клеточных эпитопах HA вирусом гриппа получена из базы данных иммунологических эпитопов (IEDB – Immune Epitope DataBase and analysis resource; www.iedb.org), а также из базы данных белков (PDB – Protein Data Bank; www.rcsb.org). Синим выделена H1-подгруппа вирусом гриппа (H1, H5 и H2), зеленым – H3-подгруппа, красным – антитела к стержневой части HA различных вирусом гриппа. С.т. – стержневая часть, Р.с.к. – рецепторсвязывающий карман, Р.э.с. – сайт, локализованный в рудиментарном эстеразном субдомене, H. s. – *Homo sapiens*, M. m. – *Mus musculus*.



цепторсвязывающего сайта формируют петли 130, 150, 220 и  $\alpha$ -спираль 190, которые обозначают позиции в аминокислотной последовательности HA [25]. Структурная характеристика нескольких антител, связанных с рецепторсвязывающим сайтом, показала, что все антитела встраивают вариабельную петлю в рецепторсвязывающий сайт и таким образом прямо блокируют взаимодействие HA с клеточными сиаловыми кислотами [26–32]. Однако из-за компактности этого сайта большинство антител встраиваются только с помощью одной петли, и лишь некоторые антитела взаимодействуют двумя петлями. Поскольку сайт связывания с рецептором находится в глобулярной части HA, это не создает стерических преград для формирования антител к этому антигенному сайту.

Антитела 1F1 получены от людей, перенесших пандемию гриппа 1918 года. Эти антитела способны ингибировать некоторые штаммы вируса гриппа А подтипа H1: изоляты 1918, 1943, 1947 и 1977 годов [28]. Изучение кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA вируса гриппа 1918 года показало, что они взаимодействуют с аминокислотными остатками, принадлежащими к антигенным сайтам Sa, Sb и Ca<sub>2</sub>. Тяжелая цепь антитела 1F1 также контактирует с рецепторсвязывающим сайтом, взаимодействуя с аминокислотными остатками, принимающими участие в связывании сиаловых кислот.

Антитела SN65 и SN67 связывают и нейтрализуют вирусы гриппа подтипа H1, которые циркулируют в человеческой популяции начиная с 1986 года [27, 33]. Однако эти антитела не обладают активностью против пандемического вируса гриппа H1 2009 года. Антитела 5J8 активны против HA подтипов H1 как пандемических вирусов гриппа 1918 и 2009 годов, так и против сезонных вирусов гриппа А. Исследование кристаллической структуры антител SN65, SN67 и 5J8 в комплексе с HA обнаружило, что все они распознают эпитопы возле рецепторсвязывающего сайта и встраивают их HCDR3-петлю в рецепторсвязывающий карман.

Вирусы подтипа H2N2 циркулировали в человеческой популяции в течение 11 лет, с 1957 по 1968 год. Вследствие длительного отсутствия этих вирусов иммунитет у населения значительно снизился, а у лиц, родившихся после 1968 года, полностью отсутствует, поэтому вероятность возвращения вирусов этого подтипа очень высока, что, несомненно, вызывает беспокойство. С помощью гибридной технологии от доноров были получены антитела к подтипу H2N2 – 8F8, 8M2 и 2G1, которые распознают и нейтрализуют все подтипы HA H2, начиная с 1957 до 1968 года [29]. Анализ кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA показал,

что они распознают рецепторсвязывающий карман. Антитела 8F8 встраивают их HCDR3-петлю в рецепторсвязывающий карман, тогда как антитела 8M2 и 2G1 – в HCDR2-петлю [29].

Описанные антитела к рецепторсвязывающему карману HA свидетельствуют о том, что этот участок глобулярной части HA более консервативен, чем такие антигенные сайты, как Sa или Sb, однако антитела к этому участку не способны распознавать HA различных подтипов. Тем не менее найдены антитела, распознающие рецепторсвязывающий карман и способные к гетеросубтипическому распознаванию HA.

Антитела C05 и S139/1 обладают гетеросубтипической активностью и могут связываться со множеством подтипов вируса гриппа, включая H1, H2 и H3 [30, 31]. Антитела S139/1 получены от мышей, иммунизированных вирусом H3N2. Это первые гетеросубтипические антитела, которые распознают рецепторсвязывающий карман, взаимодействуя с HA подтипов H1, H2, H3, H5, H9 и H13 [34]. В результате анализа кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA установлено, что они взаимодействуют с рецепторсвязывающим пакетом при помощи петли HCDR2 [31]. Изучение связывания и нейтрализации вируса подтвердило, что антитела S139/1 действительно имеют гетеросубтипическую активность, хотя и с узкой специфичностью в пределах одного подтипа. Тем не менее эти результаты позволяют предположить, что разные штаммы разных подтипов вируса гриппа А могут содержать похожий эпитоп в рецепторсвязывающем сайте.

Другие антитела – C05 – найдены при помощи фаговой библиотеки, полученной на основе клеток, выделенных от лиц, зараженных сезонным вирусом гриппа [30]. C05 оказывают нейтрализующее действие в отношении вирусов H1, H2, H3 и H9 и имеют большую широту распознавания внутри этих подтипов по сравнению с S139/1-антителами. В отличие от других описанных ранее антител, распознающих рецепторсвязывающий карман, C05 связывают HA исключительно при помощи тяжелой цепи. Основное взаимодействие опосредуется только длинной HCDR3-петлей, которая проникает в рецепторсвязывающий карман. Эпитоп к этим антителам на поверхности HA является очень компактным.

Еще одни антитела с широким гетеросубтипическим распознаванием – F045-092, также получены с помощью фаговой библиотеки на основе клеток, выделенных от доноров. Они способны распознавать и нейтрализовать различные штаммы вируса гриппа подтипов H1, H2, H3 и H5 [35]. Анализ кристаллической структуры антител F045-092 в комплексе с HA показал, что они встраивают HCDR3-петлю в рецеп-

**Таблица 2.** Взаимодействие моноклональных антител, специфичных к стержневой части НА, с различными подтипами вирусов гриппа А

Групповая классификация вирусов гриппа		Моноклональное антитело								
		C179	F10	CR6261	MAb 3.1	CR8020	CR8043	Fab 39.29	FI6v3*	CR9114**
	H9	+	+	+	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H8	н.т.	+	+	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H12	-	н.т.	-	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H6	+	+	+	+	-	-	н.т.	н.т.	+
	H1	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	H2	+	+	+	+	-	-	+	н.т.	+
	H5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	H11	н.т.	+	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H13	-	-	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H16	-	-	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H3	-	-	-	-	+	н.т.	+	+	+
	H4	-	-	-	-	+	н.т.	н.т.	н.т.	+
	H14	-	-	-	-	н.т.	+	н.т.	н.т.	н.т.
	H10	-	-	-	-	+	н.т.	н.т.	н.т.	+
	H7	-	-	-	-	+	+	+	+	+
H15	-	-	-	-	н.т.	+	н.т.	н.т.	н.т.	

**Примечания.** «+» – нейтрализация вируса гриппа, «-» – не выявлено взаимодействие с НА, «н.т.» – не тестировали. Красным показана группа H1 вирусов гриппа, зеленым – группа H3.

\*Антитела FI6v3 взаимодействуют с другими подтипами НА, но нейтрализация вируса не исследована.

\*\*CR9114 взаимодействуют с вирусом гриппа В, но не нейтрализуют его.

торсвязывающий карман, причем карбоксильная группа аспартата на верхушке распознающей петли мимикрирует карбоксильную группу сиаловых кислот [32]. Вероятно, благодаря рецепторной мимикрии достигается большая широта распознавания различных подтипов вируса гриппа А.

#### АНТИТЕЛА К СТЕРЖНЕВОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ НА

Первоначально описанные антигенные сайты располагались только на глобулярном домене НА, и какое-то время была распространена точка зрения, согласно которой стержневой регион считался недоступным для гуморального иммунного ответа. Однако уже в 1993 году были описаны антитела С179, полученные в мышах, иммунизированных вирусом гриппа H2N2, и способные нейтрализовать НА подтипов H1, H2 и H5 [11, 14]. В отличие от антител к глобулярной части, эти антитела блокировали конформационные перестройки НА при низком значении рН, подавляя таким образом его функции. Спустя 20 лет после открытия антител С179 установили их кристаллическую структуру в комплексе с НА подтипа H5. Анализ этого комплекса показал, что антитела взаимодействуют с НА при помощи как тяжелых, так и легких цепей [36].

Спустя 15 лет после открытия антител С179 были описаны еще несколько антител к стержневой части НА. Изучение структуры двух таких антител человека – CR6261 [37] и F10 [38] – в комплексе с НА показало, что они взаимодействуют с высококонсервативным эпитопом в стержневой части, общим среди НА первой группы (табл. 2). Оба антитела взаимодействуют с НА только с помощью тяжелых цепей, вставляя петлю HCDR2 в гидрофобный карман.

Другие моноклональные гетеросубтипические антитела (MAb 3.1) были получены от доноров с использованием фаговой библиотеки. Антитела MAb 3.1 способны нейтрализовать вирусы гриппа подгруппы H1a (H1, H2, H5 и H6), но имеют слабую нейтрализующую активность против подгруппы H1b (H13, H16 и H11) [39]. Подобно другим гетеросубтипическим антигриппозным антителам CR6261 и F10, MAb 3.1 контактируют со стержневой частью НА, используя только тяжелую цепь, однако у MAb 3.1 в отличие от них во взаимодействии участвуют петли HCDR1 и HCDR3.

Найдены также антитела, которые взаимодействуют исключительно со второй группой НА. Так, например, антитела CR8020, выделенные от здорового донора, связывают высококонсервативный эпитоп стержневой части НА и проявляют нейтрализую-

ющую активность против вирусов H3, H7 и H10 [39]. Позднее были получены другие антитела, CR8043, которые, в отличие от CR8020, кодируются другими генными сегментами [40]. В опытах *in vitro* CR8043 проявляли нейтрализующую активность против подтипов H3 и H10 вируса гриппа и защищали мышь от летальной дозы вирусов H3N2 и H7N7 [41]. Антитела CR8020 и CR8043 связывают схожие эпитопы, но с HA взаимодействуют по-разному. Оба антитела взаимодействуют как с легкими, так и с тяжелыми цепями HA. Подобно антителам, связывающим первую группу HA, антитела CR8020 и CR8043 также взаимодействуют со стержневой частью молекулы HA и предотвращают его конформационные изменения при низких значениях pH. Эти антитела также ингибируют процесс созревания HA, блокируя протеолитическое расщепление незрелого предшественника HA0 на субъединицы HA1 и HA2. Таким образом, обнаруженные и структурно охарактеризованные эпитопы к этим антителам представляют собой второе уязвимое место на стержневой части молекулы HA.

Описаны моноклональные антитела, обладающие гетеросубтипической активностью как против первой (H1), так и против второй (H3) группы вирусов гриппа А. В 2011 году впервые охарактеризовали подобные пангетеросубтипические антитела FI6v3, выделенные из библиотеки, состоящей из 104 000 плазматических клеток, полученных от восьми доноров, при помощи метода культивирования единичных клеток [42]. Антитела FI6v3 обладали вируснейтрализующей активностью против вирусов обеих групп и ингибировали формирование синцития в культуре клеток. Подобные им Fab-фрагменты моноклональных антител Fab 39.29 получены с помощью метода «*in vitro* активирования и обогащения антигенспецифическим способом» 840 плазмобластов вакцинированных индивидов [43].

Еще одни пангетеросубтипические антитела CR9114 связывают консервативный эпитоп на стержневой части HA и в тестах нейтрализации проявляют активность против всех проверяемых штаммов вируса гриппа А [44]. Более того, эти антитела способны взаимодействовать с вирусом гриппа В, однако в опытах *in vitro* нейтрализация вируса гриппа В не была выявлена, по крайней мере в тестируемых концентрациях. Таким образом, в настоящее время антитела CR9114 являются антителами с самой широкой специфичностью из всех изученных моноклональных антител к HA вирусов гриппа А.

Найдены также гетеросубтипические антитела к вирусам гриппа В. В частности, антитела CR8059 и CR8071 способны нейтрализовать вирусы гриппа В обеих линий [44].

Возможность получения однодоменных антител с перекрестной нейтрализующей активностью впервые показана в отношении подтипов H1, H2, H5, H9 вируса гриппа. Четыре перекрестно нейтрализующих антитела (R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5 и R1a-B6) связывались с HA полной длины, но не с доменом HA1, а также утрачивали связь с HA при низком pH. Эти антитела связываются с эпитопами в мембранной проксимальной области стержня HA вдали от сайта связывания рецептора. Подобный механизм перекрестной нейтрализации описан для моноклональных антител F10 человека и CR6261. Одно из антител (R2a-G8) связывается с частью домена HA1, который находится в области стержня HA [18].

На основании сказанного по широте распознавания все антитела можно классифицировать на четыре группы.

- 1) Антитела к глобулярной части, распознающие один или небольшое количество штаммов в пределах одного подтипа HA (2D1).
- 2) Антитела к глобулярной части, распознающие большое количество штаммов или все штаммы в пределах одного подтипа HA (H5M9, HC45, BH151, 8F8, 8M2, 2G1 и др.).
- 3) Антитела к глобулярной части, способные распознавать несколько штаммов различных подтипов HA (C05 и S139/1).
- 4) Антитела к стержневой части, достигающие выраженной гетеросубтипической активности (C179, F10, CR6261, CR8020, FI6v3, MAб 3.1, CR8043, Fab 39.29, CR9114).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникающие время от времени эпидемические вспышки гриппа в вакцинированных популяциях безусловно свидетельствуют о необходимости продолжения поиска средств экстренной профилактики, а также лечения этого заболевания. Особую важность при этом приобретают средства защиты от пандемических штаммов вируса гриппа.

Для экстренной профилактики гриппа, вызываемого вирусом, изменчивым в отношении главного антигена – гемагглютинаина, наиболее интересной представляется идея разработки препаратов широкого спектра действия, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов.

В данной работе рассмотрена возможность распознавания различных В-клеточных эпитопов HA нейтрализующими антителами широкого спектра действия, что весьма актуально в связи с эволюцией вирусов гриппа.

В результате компьютерного анализа известных конформационных В-клеточных эпитопов HA виру-

сов гриппа показано, что мишенью при поиске и создании антител широкого спектра действия к вирусу гриппа является стержневая часть молекулы НА, антитела к которой обладают выраженной гетеросубтипической активностью. Из всех полученных и исследованных к настоящему времени моноклональных антител к НА вирусов гриппа А самую широкую перекрестную нейтрализующую активность проявляют антитела CR9114. Найдены также гетеро-

субтипические антитела CR8059 и CR8071 к вирусам гриппа типа В.

Полученные данные свидетельствуют о возможности получения препаратов широкого спектра действия для экстренной профилактики и лечения гриппа с применением моноклональных или однодоменных антител, нейтрализующих определенные В-клеточные эпитопы в стержневой части НА вируса гриппа.●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Webster R.G., Govorkova E.A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014. V. 1323. P. 115–139.
- Murphy B.R., Webster R.G. *Orthomyxoviruses. Virology*. 2nd ed. / Eds Fields B.N., Knipe D.M. N.Y.: Raven Press, 1990. P. 1091–1152.
- Kilbourne E.D. *Influenza*. N.Y.: Plenum Publ. Co., 1987.
- Webster R.G., Bean W.G., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawakita Y. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. P. 152–179.
- Kilbourne E.D. // *Nat. Medicine*. 1999. V. 5. P. 1119–1120.
- Wiley D.C., Skehel J.J. // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 365–394.
- Graves P.N., Schulman J.L., Yong J.F., Palese P. // *Virology*. 1983. V. 126. P. 106–116.
- Laver W.G., Air G.M., Dopheide T.A., Ward C.W. // *Nature*. 1980. V. 283. P. 454–457.
- Raymond E.L., Caton A.J., Cox N.J., Kendal A.P., Brownlee G.G. // *Virology*. 1986. V. 148. P. 275–287.
- Verhoeven M., Fang R., Min Jou W., Devos R., Huylebroeck D., Saman E., Fiers W. // *Nature*. 1980. V. 286. P. 771–776.
- Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Ueda S. // *J. Virol.* 1993. V. 67. № 5. P. 2552–2558.
- Air G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 7639–7643.
- Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. // *Virology*. 1991. V. 182. P. 475–485.
- Смирнов Ю.А., Липатов А.С., Окуно И., Гительман А.К. // *Вопросы вирусологии*. 1999. Т. 44. С. 111–115.
- Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Gitelman A.K., Okuno Y., van Beek R., Osterhaus A.D., Claas E.C. // *Acta Virologica*. 1999. V. 43. P. 237–244.
- Ibañez L.I., De Filette M., Hultberg A., Verrips T., Temperton N., Weiss R.A., Vandeveld W., Schepens B., Vanlandschoot P., Saelens X. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 203. № 8. P. 1063–1072.
- Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
- Hufton S.E., Risle P., Ball C.R., Major D., Engelhardt O.G., Poole S. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e103294.
- Xu R., Ekiert D.C., Krause J.C., Hai R., Crowe J.E., Jr., Wilson I.A. // *Science*. 2010. V. 328. № 5976. P. 357–360.
- Zhu X., Guo Y.H., Jiang T., Wang Y.D., Chan K.H., Li X.F., Yu W., McBride R., Paulson J.C., Yuen K.Y., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 23. P. 12619–12635.
- Fleury D., Barrère B., Bizebard T., Daniels R.S., Skehel J.J., Knossow M. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 6. P. 530–534.
- Fleury D., Daniels R.S., Skehel J.J., Knossow M., Bizebard T. // *Proteins*. 2000. V. 40. № 4. P. 572–578.
- Cho K.J., Hong K.W., Kim S.H., Seok J.H., Kim S., Lee J.H., Saelens X., Kim K.H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2. P. e89803.
- Martín J., Wharton S.A., Lin Y.P., Takemoto D.K., Skehel J.J., Wiley D.C., Steinhauer D.A. // *Virology*. 1998. V. 241. № 1. P. 101–111.
- Skehel J.J., Wiley D.C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 531–569.
- Hong M., Lee P.S., Hoffman R.M., Zhu X., Krause J.C., Laursen N.S., Yoon S.I., Song L., Tussey L., Crowe J.E., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 22. P. 12471–12480.
- Whittle J.R., Zhang R., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Dormitzer P.R., Haynes B.F., Walter E.B., Moody M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 34. P. 14216–14221.
- Tsibane T., Ekiert D.C., Krause J.C., Martinez O., Crowe J.E., Wilson I.A., Basler C.F. // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 12. P. e1003067.
- Xu R., Krause J.C., McBride R., Paulson J.C., Crowe J.E., Jr., Wilson I.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 3. P. 363–370.
- Ekiert D.C., Kashyap A.K., Steel J., Rubrum A., Bhabha G., Khayat R., Lee J.H., Dillon M.A., O’Neil R.E., Faynboym A.M., et al. // *Nature*. 2012. V. 489. № 7417. P. 526–532.
- Lee P.S., Yoshida R., Ekiert D.C., Sakai N., Suzuki Y., Takada A., Wilson I.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 42. P. 17040–17045.
- Lee P.S., Ohshima N., Stanfield R.L., Yu W., Iba Y., Okuno Y., Kurosawa Y., Wilson I.A. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3614.
- Schmidt A.G., Xu H., Khan A.R., O’Donnell T., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Suphaphiphat P., Carfi A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 1. P. 264–269.
- Yoshida R., Igarashi M., Ozaki H., Kishida N., Tomabechi D., Kida H., Ito K., Takada A. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000350.
- Ohshima N., Iba Y., Kubota-Koketsu R., Asano Y., Okuno Y., Kurosawa Y. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 21. P. 11048–11057.
- Dreyfus C., Ekiert D.C., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 12. P. 7149–7154.
- Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M.A., Friesen R.H., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I.A. // *Science*. 2009. V. 324. № 5924. P. 246–251.
- Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 3. P. 265–273.
- Wyrzucki A., Dreyfus C., Kohler I., Steck M., Wilson I.A., Hangartner L. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 12. P. 7083–7092.
- Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
- Friesen R.H., Lee P.S., Stoop E.J., Hoffman R.M., Ekiert D.C., Bhabha G., Yu W., Juraszek J., Koudstaal W., Jongeneelen M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 1. P. 445–450.

42. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
43. Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., Lin Z., Chiu H., Fong R., Yan D., Kim J., Zhang J., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 14. № 1. P. 93–103.
44. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., et al. // *Science*. 2012. V. 337. № 6100. P. 1343–1348.
45. Cho K.J., Lee J.H., Hong K.W., Kim S.H., Park Y., Lee J.Y., Kang S., Kim S., Yang J.H., Kim E.K., et al. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1712–1722.
46. Barbey-Martin C., Gigant B., Bizebard T., Calder L.J., Wharton S.A., Skehel J.J., Knossow M. // *Virology*. 2002. V. 294. № 1. P. 70–74.
47. Fleury D., Wharton S.A., Skehel J.J., Knossow M., Bizebard T. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 2. P. 119–123.
48. Kostolanský F., Varecková E., Betáková T., Mucha V., Russ G., Wharton S.A. // *J. Gen. Virol.* 2000. V. 81. P. 1727–1735.
49. Churchill M.E., Stura E.A., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A., Kono D.H., Balderas R.S., Fieser G.G., Schulze-Gahmen U., Wilson I.A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 241. № 4. P. 534–556.
50. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
51. Caton A.J., Brownlee G.G., Yewdell J.W., Gerhard W. // *Cell*. 1982. V. 31. P. 417–427.

УДК 577.218

# МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного воспаления

Н. М. Баулина<sup>1,2\*</sup>, О. Г. Кулакова<sup>1,2</sup>, О. О. Фаворова<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1<sup>2</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

\*E-mail: tati.90@mail.ru

Поступила в редакцию 30.07.2015

Принята к печати 24.11.2015

**РЕФЕРАТ** МикроРНК – малые некодирующие РНК, контролирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне за счет связывания с 3'-нетранслируемой областью мРНК-мишени с ее последующей деградацией или репрессией трансляции. Формируя сложную регуляторную сеть, микроРНК в совокупности изменяют экспрессию более 60% генов человека. МикроРНК являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, воздействующими на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы, на продукцию антител и высвобождение медиаторов воспаления. Нарушение этой регуляции может приводить к формированию различных патологических состояний, в том числе и аутоиммунному воспалению. В обзоре обобщены сведения о биогенезе и механизме действия микроРНК. Рассмотрена роль системы микроРНК в развитии и функционировании иммунной системы, а также участие микроРНК в развитии аутоиммунного воспалительного процесса. Особое внимание уделено роли микроРНК в развитии аутоиммунного воспаления при рассеянном склерозе – тяжелом социально значимом заболевании центральной нервной системы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аутоиммунное воспаление, микроРНК, рассеянный склероз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АИЗ – аутоиммунные заболевания; АПК – антигенпредставляющие клетки; ВПРС – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз; ДК – дендритные клетки; МНК – мононуклеарные клетки крови; РРС – ремиттирующий рассеянный склероз; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; НК – натуральные киллеры; Th1/2/17 – Т-хелперные клетки типа 1/2/17; TLR – Толл-подобные рецепторы; Treg – регуляторные Т-клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших результатов проекта ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), направленного на расшифровку функциональной части генома, стало осознание факта, что более 80% генома имеют определенную биологическую функцию, в основном связанную с регуляцией экспрессии генов, кодирующих белки. Среди выявленных функциональных элементов наиболее представлены гены, кодирующие регуляторные РНК различного типа, в том числе и микроРНК (короткие, размером от 19 до 24 нуклеотидов, одноцепочечные молекулы РНК), которые служат ключевыми регуляторами различных биологических процессов на посттранскрипционном уровне [1].

Первая микроРНК (*lin-4*) была идентифицирована у нематоды *Caenorhabditis elegans* еще в 1993 г.,

однако только обнаружение у *C. elegans* в 2000 г. второй микроРНК (*let-7*) стало толчком к началу активного изучения микроРНК у позвоночных и беспозвоночных [2]. К настоящему моменту микроРНК обнаружены у животных, растений, протистов и вирусов [3]. Данные о микроРНК хранятся в ряде баз данных, таких, как miRBase, microRNA.org, MicroRNadb, miR2Disease, HMDD, PhenomiR. По данным последней версии miRBase (v21), всего у 223 видов найдено 35828 зрелых микроРНК, из них 2588 зрелых микроРНК идентифицированы в организме человека [4].

МикроРНК являются высококонсервативными молекулами. Эволюционно родственные микроРНК объединены в 239 различных семейств, члены которых имеют высокомолекулярные последовательности и некоторые общие мишени [5]. Исследования

последних лет показали, что микроРНК необходимы для нормального развития различных физиологических систем организмов и поддержания клеточного гомеостаза, а изменение их экспрессии и/или функционирования сопряжено с развитием многих болезней человека, включая онкологические, инфекционные, нейродегенеративные и аутоиммунные [4]. В этом обзоре мы кратко остановимся на биогенезе и механизме действия микроРНК, а затем рассмотрим участие микроРНК в регуляции иммунной системы и аутоиммунного воспалительного процесса, уделяя особое внимание участию микроРНК в развитии рассеянного склероза (РС) – хронического аутоиммунного воспалительного заболевания центральной нервной системы.

### БИОГЕНЕЗ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ микроРНК

Большинство микроРНК кодируется генами, расположенными в интронах генов, кодирующих белки; гены микроРНК могут локализоваться также в экзонах, 5'- и 3'-нетранслируемых участках генов или в межгенных областях [6].

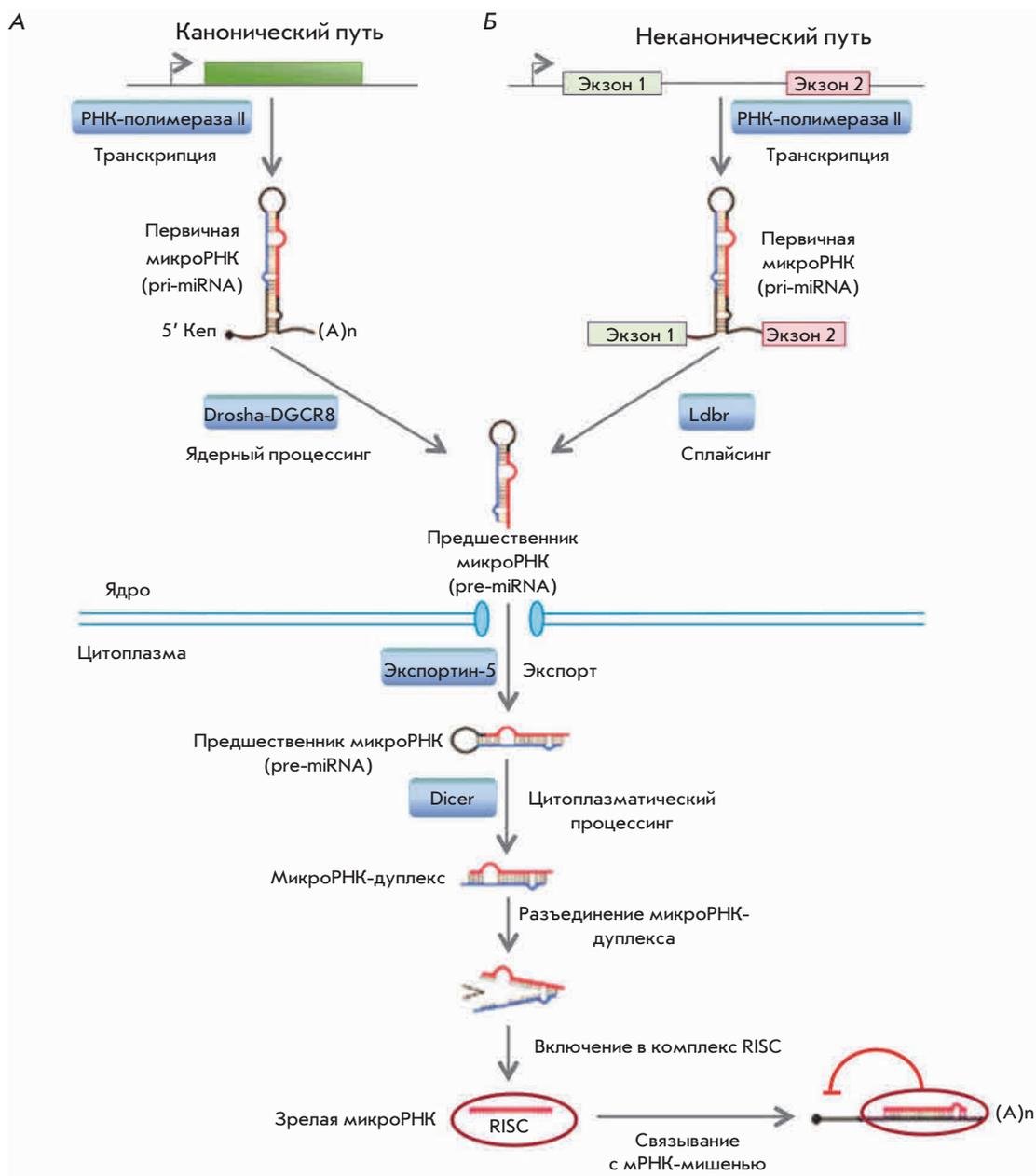
Гены микроРНК транскрибируются в ядре в основном с помощью РНК-полимеразы II в виде первичной микроРНК (pri-miRNA) – длинного транскрипта (от нескольких сотен до десятков тысяч нуклеотидов) (рис. 1). Первичная микроРНК затем преобразуется в предшественника микроРНК (пре-микроРНК, или pre-miRNA) с помощью микропроцессорного комплекса Drosha-DGCR8 (канонический путь) [6]. Существуют еще несколько неканонических путей образования пре-микроРНК, один из которых состоит в образовании пре-микроРНК при сплайсинге коротких шпильчатых интронов – митронов (mirtrons) и последующего вырезания пре-микроРНК с помощью белка Ldbr [7]. Далее пути биогенеза микроРНК объединяются, и пре-микроРНК процессируется в цитоплазме с помощью фермента Dicer (РНКаза III) с образованием микроРНК-дуплекса, одна из цепей которого участвует в формировании комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) (рис. 1).

Для связывания микроРНК в составе комплекса RISC с мРНК-мишенью критичен небольшой участок микроРНК размером 6–8 нуклеотидов – «seed region» (затравочная область). Степень комплементарности между этим участком микроРНК и мРНК-мишенью во многом определяет механизм регуляции экспрессии генов. Полное комплементарное связывание микроРНК с мРНК приводит к разрезанию и деградации последней. При неполной комплементарности микроРНК и мРНК-мишени трансляция мРНК подавляется на стадиях инициации или элонгации, мРНК дестабилизируется в результате отщепления полиА-последовательности и направляется

в Р-тельца (processing bodies). МикроРНК может действовать на транскрипционном уровне за счет регуляции реорганизации хроматина [9]. В большинстве случаев микроРНК снижают уровень экспрессии мРНК-мишени, однако в некоторых случаях показано, что связывание микроРНК с определенными белковыми комплексами может увеличивать экспрессию генов-мишеней посредством прямого или опосредованного механизмов [10].

Сейчас известно, что микроРНК функционируют не только внутри отдельных клеток, но также могут выходить в кровяное русло и воздействовать на другие клетки организма животных. Внеклеточная зрелая микроРНК (90–99%) находится в основном в крови в комплексе с белками семейства AGO [11]. Кроме того, пре-микроРНК может секретироваться в кровяное русло в составе экзосом и/или мультивезикулярных телец. Экзосомы, в свою очередь, могут захватываться клетками-реципиентами (в том числе и клетками других типов), в цитоплазме которых пре-микроРНК процессируется в зрелую микроРНК. МикроРНК может также высвобождаться из клетки при апоптозе [12].

Для обозначения гена, кодирующего микроРНК, ее предшественника и зрелой молекулы микроРНК, существует специальная номенклатура, однако, она еще не стала общепринятой. Так, для гена, кодирующего микроРНК, используют две аббревиатуры: *mir*, или *MIR*, например, *mir142* или *MIR142*. Аббревиатуру «*mir*» используют также для обозначения первичной микроРНК и пре-микроРНК, а зрелую микроРНК называют «*miR*». Принадлежность *miR* к какому-либо виду обозначают тремя буквами – «*hsa*» перед *miR* человека (*Homo sapiens*) и «*rno*» – перед *miR* крысы (*Rattus norvegicus*) – например, *hsa-miR-367* или *rno-miR-1*. Группы близкородственных микроРНК, обладающих сходной последовательностью, объединяют в семейства, обозначаемые номерами (например, *miR-33*), а внутри одного семейства выделяют отдельные микроРНК, добавляя к общему названию однобуквенный суффикс, например, *hsa-miR-451a* и *hsa-miR-451b*. Пре-микроРНК, дающие начало идентичным зрелым микроРНК, но кодируемые в разных локусах генома, имеют в названии дополнительную цифру, отделенную дефисом, например, из предшественников *hsa-mir-121-1* и *hsa-mir-121-2* получается идентичная зрелая микроРНК *hsa-miR-121*. Если известно, какая из цепей микроРНК-дуплекса преимущественно связывается с мРНК-мишенью (так называемая «направляющая» цепь), то ее обозначают, например, *miR-56*, а комплементарную ей нестабильную («пассажирскую») цепь помечают звездочкой (например, *miR-56\**). Если данные о функциональной активности



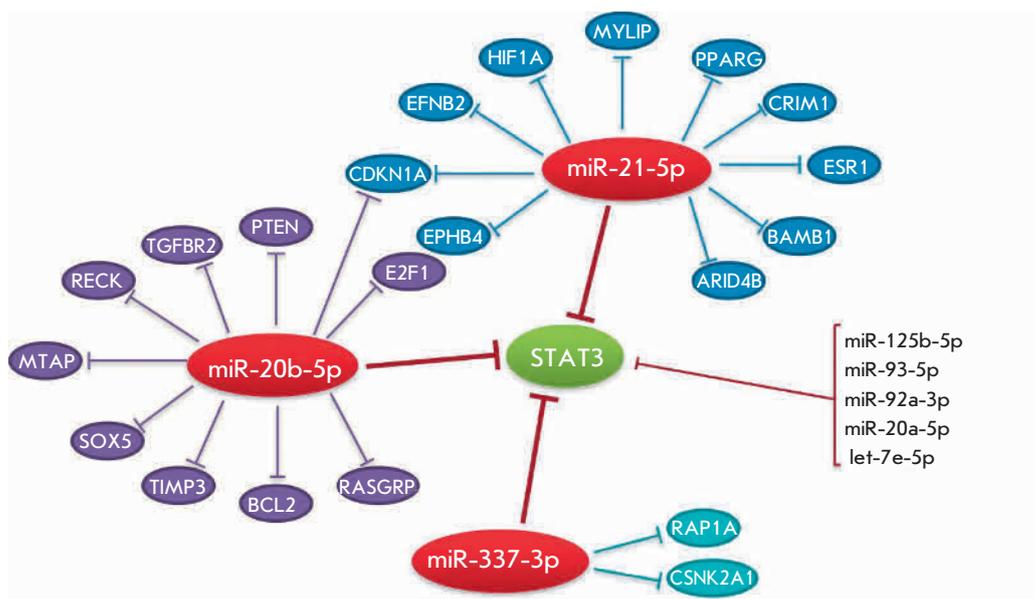
**Рис. 1.** Биогенез микроРНК (модифицировано из [8]). А – канонический путь образования пре-микроРНК с помощью микро-процессорного комплекса Drosha-DGCR8. Б – неканонический путь, при котором пре-микроРНК образуется в результате сплайсинга митрона и последующего вырезания пре-микроРНК с помощью белка Ldbr. Далее пути биогенеза микроРНК объединяются. Зеленый прямоугольник – ген, кодирующий микроРНК. Экзоны 1 и 2 – экзоны гена, в интроне которого расположен ген микроРНК

цепей микроРНК-дуплекса отсутствуют, то указывают, с каким из концов пре-микроРНК соотносится образовавшаяся в результате процессинга цепь микроРНК-дуплекса, например, miR-142-5p (5'-конец пре-микроРНК) и miR-142-3p (3'-конец пре-микроРНК).

Как и действие цитокинов, функционирование микроРНК характеризуется вырожденностью (избыточностью) и плейотропностью, т.е. уровень экспрессии одной мРНК может регулироваться многими микроРНК, а одна микроРНК связывается со многими мРНК-мишенями, что приводит к формированию сложной регуляторной сети (рис. 2). Таким образом,

изменение экспрессии одной микроРНК может привести к изменениям в профиле экспрессии многих мРНК-мишеней, однако для каждой отдельной мРНК этот эффект будет зависеть также от влияния других микроРНК.

Показано, что избыточность системы микроРНК может в совокупности привести к изменению экспрессии около 60% генов организма [13]. Следует отметить, что уровень экспрессии генов микроРНК, как и генов, кодирующих белки, может регулироваться на эпигенетическом уровне, в процессе транскрипции, процессинга и ядерного экспорта, а также контролируется степенью деградации микроРНК [14].



**Рис. 2.** Избыточность и плейотропность регуляторной системы микроРНК. В качестве примера представлены данные о регуляции мРНК-мишени, которая кодирует транскрипционный фактор STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (зеленый овал). В красных овалах – miR, подавляющие экспрессию гена STAT3, каждая из которых ингибирует также другие мРНК-мишени (в синих, фиолетовых и голубых овалах). Справа – перечень дополнительных микроРНК, которые, возможно, тоже влияют на экспрессию STAT3. Регуляторная сеть STAT3 смоделирована для этого обзора на основании данных сайта Mirtarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>)

Спектр используемых организмом микроРНК напрямую зависит от сложности строения организма. Кроме того, экспрессия микроРНК является тканеспецифичной и онтогенетически ориентированной. Таким образом, по мере расширения наших представлений становится все более очевидным, что сеть микроРНК представляет собой необходимый и эволюционно древний компонент системы регуляции экспрессии генов.

**УЧАСТИЕ микроРНК В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

За последние годы проведено большое число исследований, показывающих, что микроРНК критичны для развития элементов иммунной системы. Показано, что профили экспрессии микроРНК различных гемопоэтических органов и типов клеток различаются, причем экспрессия специфических наборов микроРНК меняется в процессе дифференцировки клеток иммунной системы. Например, обнаружено, что miR-142a, miR-181a и miR-223 предпочтительно экспрессируются в гемопоэтических клетках [15]. Важность микроРНК для развития иммунной системы показана также на транс-

генных мышцах. Нокаут гена *Dicer*, необходимого для нормального созревания микроРНК, приводит к серьезным нарушениям развития и функционирования клеток иммунной системы мышцей и летальному исходу в раннем эмбриональном периоде [16]. Сегодня мы знаем, что микроРНК являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, действующими на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы, на продукцию антител и высвобождение медиаторов воспаления. Они необходимы для нормального функционирования как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

**МикроРНК и регуляция врожденного иммунитета**

Врожденный иммунитет – это первая линия защиты организма от инфекционных агентов и инициатор воспалительного ответа с участием моноцитов, макрофагов, гранулоцитов, дендритных клеток (ДК) и натуральных киллеров (НК-клеток).

Моноциты и ДК способны распознавать микробные компоненты через Toll-подобные рецепторы (TLR), запуская каскад воспалительных реакций. Недавно показали, что функционирование клеток

Лангерганса – одного из подтипов ДК – строго зависит от фермента Dicer, участвующего в образовании зрелых микроРНК. В отсутствие Dicer увеличивается скорость обновления клеток и их апоптоза, что приводит к прогрессирующему уменьшению числа клеток Лангерганса *in vivo* [17]. Показано также, что дифференцировка гранулоцитов в клетках человека регулируется miR-223 [18], а в дифференцировке моноцитов участвуют микроРНК, относящиеся к кластерам miR-17-92 и miR-106a-92 [19].

После распознавания консервативных структур различных патогенов рецепторами TLR на поверхности ДК и моноцитов инициируется каскад передачи сигнала в клетку, в котором задействованы важнейшие специфические киназы IRAK-1, -2 или -4 (киназы, ассоциированные с интерлейкином-1 (IL-1)), а также фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей (TRAF6). В результате стимулируется высвобождение цитокинов, обладающих провоспалительным и противовирусным действием, таких, как интерферон IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  и фактор некроза опухолей (TNF) [17]. Все эти этапы также регулируются микроРНК. Так, miR-155, синтез которой индуцируется многими лигандами TLR-рецепторов, участвует в выживаемости и активации клеток иммунной системы за счет связывания со своими мишенями, такими, как SHIP1 (Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1) и SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), негативными регуляторами иммунного ответа [20]. Это ведет к стимулированию синтеза провоспалительных цитокинов и, как следствие, к активации адаптивного иммунного ответа. Экспрессия гена *MIR146A* немедленно индуцируется липополисахаридом – компонентом клеточных стенок грамотрицательных бактерий, а сама miR-146a способна комплементарно связываться с 3'-UTR мРНК IRAK-1 и TRAF6, ингибируя продукцию этих ключевых сигнальных белков, что приводит к ингибированию активации фактора NF- $\kappa$ B и к уменьшению продукции провоспалительных цитокинов – IL-6 и TNF [21].

В ответ на липополисахариды в моноцитарных клеточных линиях и в макрофагах также существенно повышается экспрессия miR-132, -125b, -21, -9, что указывает на участие микроРНК в контроле сигнального пути TLR, причем некоторые микроРНК, судя по характеру эффекта, действуют на этапе возвращения организма к нормальному гомеостазу после ответа на инфекцию. Подобная регуляция по механизму обратной связи очень важна, поскольку не только пониженная, но и повышенная активация сигнального пути TLR может нанести вред организму [22].

НК-клетки обеспечивают раннюю защиту, разрушая трансформированные клетки, а также влияют

на развитие многих клеток иммунной системы, продуцируя различные цитокины. У периферических НК-клеток, не экспрессирующих гены биогенеза микроРНК Dicer или Pasha (*Dgcr8*), наблюдались функциональные нарушения активации клеточных рецепторов [17], что подчеркивает важность системы микроРНК для функционирования НК-клеток.

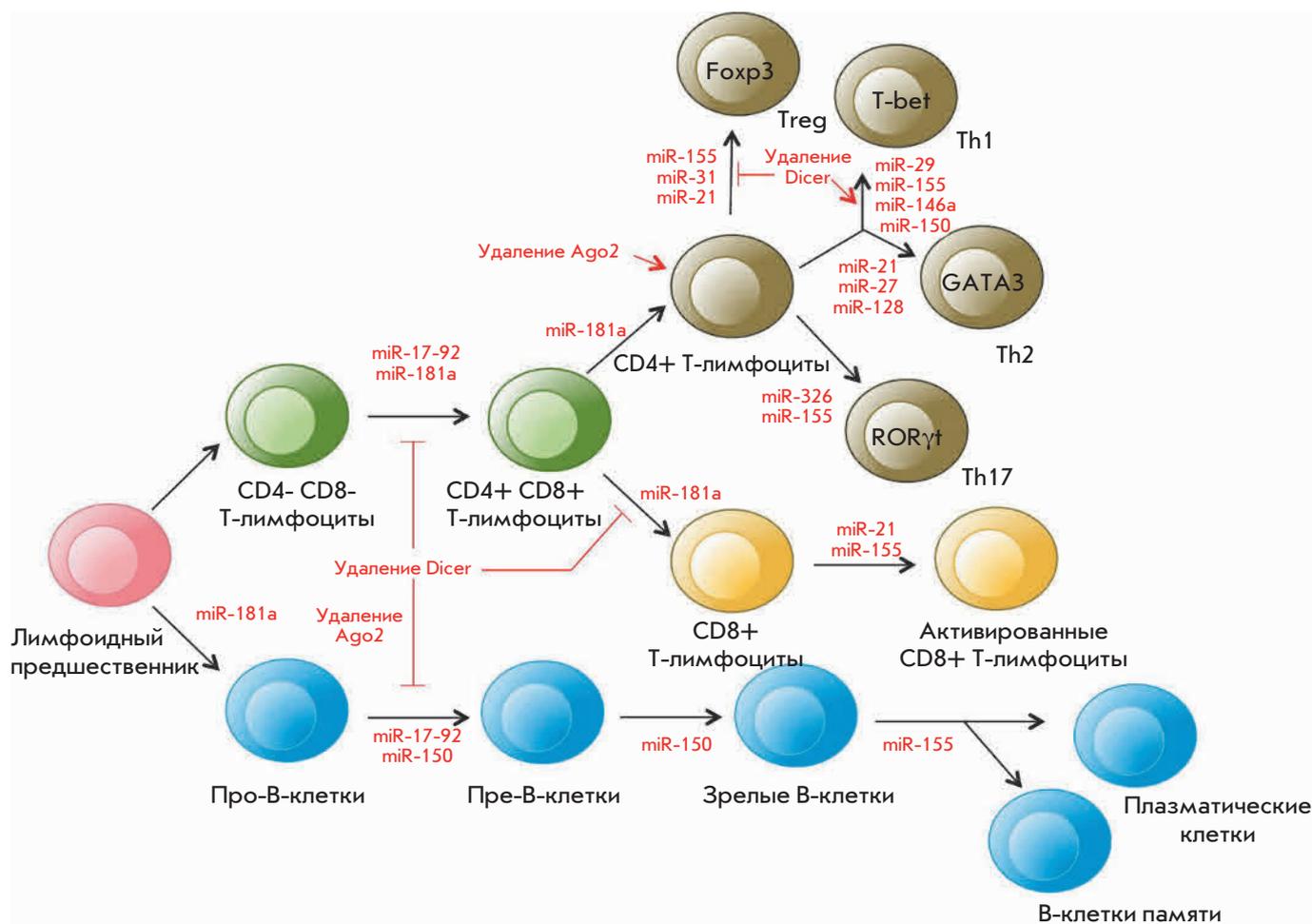
Все эти работы убедительно показывают, что микроРНК активно участвуют в регуляции врожденного иммунного ответа.

### МикроРНК и регуляция адаптивного иммунного ответа

Адаптивный иммунный ответ характеризуется специфическим распознаванием чужеродных антигенов Т- и В-лимфоцитами с последующей селекцией и размножением антигенспецифических клонов этих клеток. В результате происходит как резкое увеличение количества Т- и В-лимфоцитов, отвечающих на данный антиген, так и формирование клеток памяти организма, обеспечивающих вторичный иммунный ответ.

МикроРНК принимают активное участие в регуляции развития и дифференцировки Т- и В-клеток (рис. 3). Так, нарушение процессинга микроРНК в Т-клетках, вызванное делецией гена *Dicer*, на раннем этапе развития приводит к снижению числа тимоцитов и повышению их апоптоза [23]. В отсутствие белка Dicer или AGO2 нарушается дифференцировка В-клеток на разных этапах и изменяется спектр секретируемых антител [24, 25]. Кроме того, предполагается, что дефицит Dicer влияет на программу V(D)J-рекомбинации в развивающихся В-клетках [25]. В то же время наивные Т-лимфоциты с пониженной экспрессией микроРНК и продукцией белка AGO2 более быстро дифференцируются в эффекторные Т-клетки [26].

Многие работы сфокусированы на изучении индивидуальных микроРНК, экспрессия которых специфична для каждого этапа дифференцировки В- и Т-клеток. По данным [27], выявлено более 100 микроРНК, которые потенциально могут влиять на молекулярные пути, контролируемые дифференцировку и функционирование клеток врожденного и адаптивного иммунитета. miR-181a дифференциально экспрессируется в гемопоэтических клетках и участвует в регуляции дифференцировки В- и Т-клеток на ранних этапах развития. Ингибирование miR-181a в незрелых Т-клетках нарушает как позитивную, так и негативную селекцию Т-клеток, при том, что повышенная экспрессия этой микроРНК в зрелых Т-клетках усиливает чувствительность их ответа на антиген [28]. Наряду с miR-181a, экспрессия miR-17-92 повышена в пред-



**Рис. 3.** Участие микроРНК в дифференцировке Т- и В-лимфоцитов (модифицировано из [28]). Th1/2/17 – Т-хелперные клетки типа 1/2/17; Treg – регуляторные Т-клетки; Foxp3, T-bet, GATA3, RORγt – факторы транскрипции, необходимые для нормального развития клеток соответствующего типа. Другие пояснения – в тексте

шественниках В- и Т-клеток и снижена в зрелых клетках, а miR-155 необходима для дифференцировки наивных Т-клеток в эффекторные (Treg, Th1/2, Th17) [29].

Снижение количества Dicer или Drosha в регуляторных Т-клетках (Treg) приводит к раннему развитию аутоиммунных заболеваний. Показано, что CD4+ Т-клетки, не экспрессирующие микроРНК, не могут дифференцироваться в Treg в тимусе. У мышей с нокаутом гена *MIR155* снижено количество Treg-клеток [30]. В то же время miR-21 и miR-31 регулируют дифференцировку Treg за счет изменения экспрессии основного фактора транскрипции Foxp3, необходимого для нормального развития этой субпопуляции CD4+ клеток [31]. В отличие от Treg, удаление Dicer приводит к активации дифференцировки наивных CD4+ Т-клеток в сторону Th1-клеток. Повышенная экспрессия miR-29 в наивных CD4+ Т-клетках подавляет дифференцировку Th1 и про-

дукцию IFN-γ. Показано, что miR-146a участвует в регуляции дифференцировки Th1-клеток за счет связывания с мРНК генов *Traf1* и *Irak1* (как обсуждалось ранее), а также *Stat1*. Кроме того, повышенная экспрессия miR-146a характерна для Th1, в то время как в Th2 она понижена. Повышенная экспрессия miR-21 в Т-клетках способствует дифференцировке Th2-клеток *in vitro*, а miR-27 и miR-128 – снижению продукции IL-4 и IL-5 активированными CD4+ Т-клетками. Субпопуляция клеток типа Th17 регулируется miR-326, которая, связываясь с геном-мишенью *Ets1*, усиливает дифференцировку этих клеток и продукцию IL-17 [31]. На более поздних этапах дифференцировки наблюдали повышенную экспрессию miR-155 и miR-21 в клетках CD8+ [32]. miR-150 предотвращает развитие зрелых В-клеток, но способствует активации Т-клеток за счет связывания со специфическими факторами транскрипции, в том числе с c-Myc и T-bet [33]. У мышей с нокаутом гена

*MIR155* обнаружены нарушения секреции антител и переключение синтеза изоформ В-клеток [34].

Таким образом, все больше данных свидетельствует о том, что микроРНК участвуют в регуляции иммунного ответа. Нарушение этой регуляции может приводить к формированию различных патологических состояний, в том числе и аутоиммунных воспалительных процессов.

### **МикроРНК И РАЗВИТИЕ АУТОИММУННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА**

Аутоиммунный воспалительный процесс лежит в основе патогенеза многих системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваний (АИЗ), таких, как системная красная волчанка, РС, ревматоидный артрит, сахарный диабет типа 1, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Крона и др. Причиной этих заболеваний считается негативная реакция иммунной системы на собственные ткани, которая приводит к образованию аутореактивных клеток и аутоантител, к продукции большого спектра провоспалительных цитокинов и медиаторов, а в итоге – к повреждению и разрушению нормальных тканей организма. Сейчас предполагается, что начальным толчком к развитию многих АИЗ является хроническое воспаление, которое за счет постоянно вырабатываемых аутоиммунными клетками медиаторов усугубляет негативную реакцию иммунной системы против собственного организма и по принципу обратной связи препятствует завершению иммунного ответа.

Изучение профиля микроРНК у больных АИЗ выявило многочисленные нарушения их экспрессии [35–37], причем у некоторых из них, таких, как *miR-155*, *-146a*, *-326*, *-21*, *-181*, изменения встречались наиболее часто. Специфические микроРНК, экспрессируемые клетками иммунной системы и резидентными клетками тканей, могут репрессировать синтез ключевых белков, способствуя тем самым развитию аутоиммунного воспалительного ответа на различных этапах (рис. 4). Эти этапы включают развитие воспалительной реакции; активацию антигенпредставляющих клеток (АПК); распознавание антигена специфическими рецепторами лимфоцитов, дифференцировку  $CD4^+$ Т-клеток в разные субпопуляции; функционирование Treg; продукцию различных цитокинов; передачу сигнала в резидентные клетки разных тканей в ответ на воспалительные цитокины; дополнительное рекрутирование воспалительных клеток с помощью хемокинов и цитокинов; формирование зародышевых центров В-клеток и переключение изоформ иммуноглобулинов, а также некоторые механизмы повреждения тканей, не опосредованные иммунными клетками.

Как упоминалось выше, последовательная активация некоторых микроРНК может контролировать силу и длительность воспалительного ответа, индуцируемого активацией TLR-рецепторов. Так, показано, что индукция *miR-155* и репрессия *miR-125b* и *let-7i*, вызванные активацией TLR-рецепторов, приводят к синтезу различных провоспалительных цитокинов и активации адаптивного иммунного ответа. Индукция экспрессии *miR-146a*, *-132* и *-9*, негативных регуляторов воспаления, способствует репрессии TLR-сигнализации. Индуцируемые позднее *miR-21* и *miR-147* участвуют в активации противовоспалительного ответа, ингибируя синтез *miR-155* и провоспалительных цитокинов [22].

О роли некоторых микроРНК в функционировании АПК и дифференцировке  $CD4^+$  Т-клеток мы упоминали выше. Продукция ряда цитокинов прямо регулируется микроРНК, например, *miR-29* в Т-лимфоцитах может связываться с мРНК *IFN- $\gamma$*  и ингибировать его продукцию [30], а экспрессируемая в резидентных фибробластоподобных синовиоцитах *miR-23b* способна ингибировать активацию NF- $\kappa$ B, связываясь с мРНК-мишенями генов *TAB2*, *TAB3* и *IKK- $\alpha$*  в ответ на воспалительные цитокины [38]. Таким образом, микроРНК могут регулировать взаимодействие (crosstalk) между цитокинами, продуцируемыми иммунными клетками, и передачу сигнала рецепторами цитокинов в резидентные клетки разных тканей при развитии АИЗ. МикроРНК могут быть вовлечены в рекрутирование дополнительных воспалительных клеток при участии хемокинов. Показано, что *miR-125a* участвует в негативной регуляции продукции хемокина RANTES (*CCL5*) в активированных Т-клетках при развитии системной красной волчанки [39], а увеличение экспрессии *miR-146a* ингибирует секрецию хемокинов *CCL5* и *IL-8* в эпителиальных клетках легкого человека [40]. Переключение изоформ иммуноглобулинов также может быть нарушено при отсутствии некоторых микроРНК, например, *miR-155* [34]. И, наконец, обнаружено, что активация некоторых матриксных металлопротеиназ, способствующих проникновению иммунных клеток в очаг воспаления, также регулируется микроРНК [41].

Скрининговое сравнительное исследование экспрессии микроРНК в резидентных клетках, присутствующих в очагах воспаления, у больных ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, а также на животных моделях этих заболеваний и РС выявило общие для этих аутоиммунных заболеваний нарушения в экспрессии микроРНК: экспрессия *miR-23b* и *miR-30a-5p* была повышена, а *miR-214* и *miR-146a* – снижена [38].

Накопленные данные говорят о значительной роли микроРНК в развитии АИЗ. Рассмотрим эту роль бо-

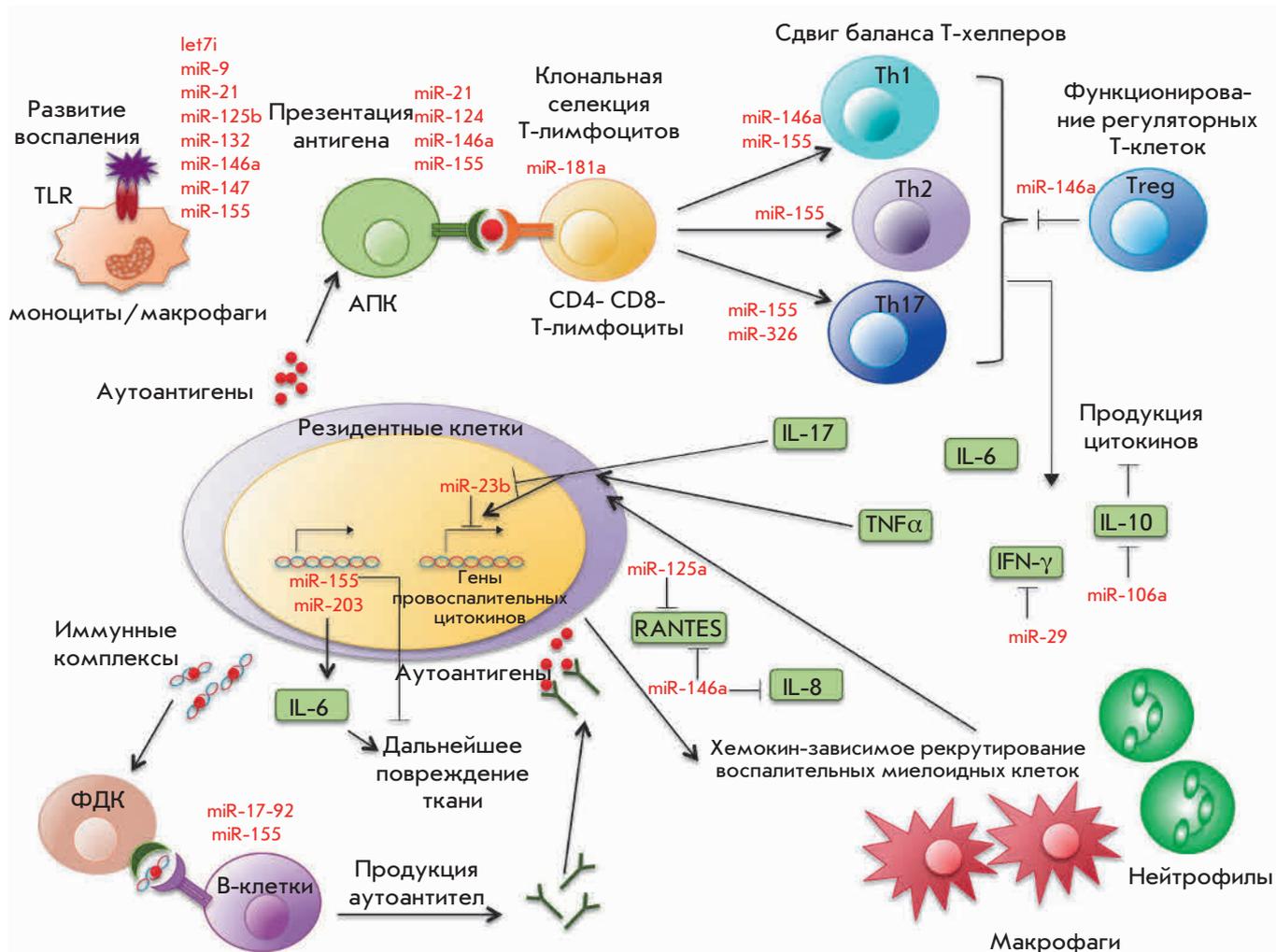


Рис. 4. Участие микроРНК в развитии аутоиммунного воспаления (модифицировано из [35]). АПК – антигенпредставляющие клетки, Th1/2/17 – Т-хелперные клетки типа 1/2/17; Treg – регуляторные Т-клетки, ФДК – фолликулярные дендритные клетки. Другие пояснения – в тексте

лее подробно на примере рассеянного склероза – одного из наиболее изучаемых АИЗ.

### РОЛЬ микроРНК В РАЗВИТИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

РС – тяжелое хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание ЦНС, при котором развивается комплекс иммуноопосредованных патологических реакций, направленных на разрушение миелиновой оболочки нейронов, что впоследствии приводит к необратимой потере неврологических функций и тяжелой инвалидизации.

В настоящее время этиология и патогенез РС выяснены не до конца, однако, многочисленные исследования указывают на иницирующую роль

аутоиммунного процесса, направленного на повреждение миелиновой оболочки нервных клеток в ЦНС. Активация анергичных Т- и В-лимфоцитов на периферии (вне ЦНС) является первым этапом иммунопатогенеза РС. При РС нарушается как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Развитие РС характеризуется сдвигом баланса CD4+ Т-хелперных клеток в сторону Th1- и Th17-субпопуляций и также нарушением функционирования Treg-клеток. Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера способствует проникновению аутореактивных клеток в ЦНС, где происходит их реактивация белками и липидами миелиновой оболочки нейронов. В дальнейшем миелин-специфические клетки участвуют в образовании патологических очагов демиелиниза-

ции (бляшек), в формировании которых также принимают участие активированные резидентные клетки ЦНС – микроглия и астроциты. Секретируемые ими цитокины и хемокины, в основном провоспалительные, дополнительно привлекают в очаги демиелинизации как аутореактивные Т- и В-лимфоциты, так и моноциты/макрофаги, которые, в свою очередь, секретируют множество активных молекул (цитокины, антитела, радикалы кислорода и азота, протеазы), участвующие в дальнейшем повреждении миелиновой оболочки и олигодендроцитов. При длительной и выраженной демиелинизации наступает гибель аксонов, приводящая к появлению стойких симптомов неврологического дефицита. В ходе повреждения олигодендроцитов и миелина высвобождается большое количество аутоантигенов, дающих толчок к дальнейшему развитию аутоиммунного процесса.

### **МикроРНК и развитие воспалительного аутоиммунного процесса при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите**

Общность иммунопатологических и нейродегенеративных процессов позволяет использовать модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) в качестве основной животной модели для изучения роли микроРНК в развитии РС.

В одной из первых работ было показано, что мыши с нокаутом гена *MIR155*, резистентны к проявлению ЭАЭ из-за снижения дифференцировки Th1- и Th17-клеток при аутоиммунном воспалении [42]. Скрининговые исследования выявили изменения в экспрессии многих микроРНК при ЭАЭ. Так, обнаружены 43 микроРНК, экспрессия которых в лимфатических узлах крыс с ЭАЭ выше, чем у крыс, резистентных к ЭАЭ [43]; 33 из этих микроРНК ранее были ассоциированы с развитием РС и других АИЗ. В олигодендроцитах мышей с ЭАЭ экспрессия 56 микроРНК была ниже, чем в олигодендроцитах здоровых мышей; самым низким был уровень экспрессии *miR-15a-5p*, *-15b-5p*, *-20b-5p*, *-106b-5p*, *-181a-5p*, *-181c-5p*, *-181d-5p*, *-320-3p*, *-328-3p* и *-338-3p* [44].

Изучение роли микроРНК в развитии ЭАЭ позволило выявить конкретные гены-мишени некоторых микроРНК и оценить их участие в патогенезе этого заболевания (табл. 1). Основным способом индукции ЭАЭ было введение мышам линий C57Bl/6 [38, 42, 47–57], SJL [45] или крысам Dark Agouti и PVG миелин-олигодендрокитарного гликопротеина, протеолипидного белка или их иммуногенных пептидов в полном адьюванте Фрейнда в сочетании с коклюшным токсином [43]. Исследования проводили преимущественно на клетках иммунной системы (в основном на CD4+ Т-лимфоцитах), а также в раз-

личных клетках нервной ткани. В CD4+ Т-клетках в основном наблюдали увеличение уровня экспрессии генов микроРНК (кроме *miR-20b* и *miR-132/212*), тогда как в клетках нервной системы экспрессия трех микроРНК была понижена, а двух – повышена. Основные мишени микроРНК и в CD4+ Т-лимфоцитах, и в клетках нервной системы – мРНК генов факторов транскрипции и модуляторов активности факторов транскрипции, генов участников сигнальных путей и цитокинов. Важно отметить, что мишенями *miR-29b* и *miR-20b* являются мРНК генов *TBX21* и *RORC*, кодирующих Т-bet и ROR $\gamma$ t – основные факторы транскрипции, участвующие в дифференцировке Th0-клеток в Th1 и Th17 соответственно. Мишенью *miR-326* служит ген *ETS1*, кодирующий фактор транскрипции, который прямо контролирует экспрессию генов цитокинов и хемокинов и участвует в регуляции дифференцировки и пролиферации лимфоидных клеток.

В число мишеней других микроРНК входят гены участников различных сигнальных путей, включая пути NF-kB (*TNFAIP3* и *CHUK*) и JAK/STAT (*STAT3*, *SMAD7*, *SOCS1* и *PIAS3*), а также гены фосфатаз (*INPP5D* и *PTEN*). Гены некоторых цитокинов (*IL-10*, *IL-6* и *IFNG*) и сигнальных путей цитокинов IL-1, IL-17 (*TAB2* и *TAB3*) также являются мишенями микроРНК, экспрессия которых изменяется при ЭАЭ.

Действие микроРНК (таких, как *let-7e*, *miR-155*, *-17-92*, *-20b*, *-21*, *-29b*, *-301a* и *-326*) на мишени в основном проявляется в нарушении дифференцировки и пролиферации клеток Th1 и Th17, которым отводят основную роль в развитии ЭАЭ. *miR-26a* и *miR-873* стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов, влияя на нейровоспалительный процесс и тяжесть течения ЭАЭ. Кроме того, *miR-155* участвует в нарушении формирования миелина, что также может вносить вклад в развитие нейродегенеративных процессов. Показано, что повышение уровня *miR-146a* при ЭАЭ в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC), дифференцированных по нейрональному пути, ингибирует синтез простагландина-E2, что может приводить к увеличению продукции TNF и IFN- $\gamma$  активированными ДК и Т-клетками [45, 46]. Снижение экспрессии *miR-124* способствует активации фагоцитарной активности и подавлению дифференцировки микроглии, что приводит к усугублению течения ЭАЭ у животных [47].

Таким образом, ЭАЭ оказался адекватной экспериментальной моделью, на которой можно изучать дифференциальную экспрессию микроРНК при аутоиммунном воспалении и выявить роль отдельных

**Таблица 1.** мРНК-мишени и возможные механизмы влияния некоторых микроРНК, экспрессия которых нарушена при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей

МикроРНК	Исследуемые клетки	Изменение экспрессии*	Гены, кодирующие мРНК-мишени	Эффект изменения экспрессии микроРНК	Ссылка
let-7e	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>IL-10</i>	Стимуляция развития клеток Th1 и Th17	[48]
miR-17	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>IKZF4</i>	Усиление поляризации Th17	[49]
miR-19b	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>PTEN</i>	Активация дифференцировки Th17	[49]
miR-20b	CD4+ Т-лимфоциты	↓	<i>RORC, STAT3</i>	Активация дифференцировки Th17	[50]
mir-21	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>SMAD7</i>	Активация дифференцировки Th17	[51]
miR-23b	Клетки спинного мозга	↓	<i>TAB2, TAB3, CHUK</i>	Стимуляция опосредованного IL-17 аутоиммунного воспаления	[38]
miR-26a	Клетки головного мозга	↓	<i>IL-6</i>	Повышенная экспрессия Th17-опосредованных цитокинов	[52]
miR-29b	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>TBX21, IFNG</i>	Регуляция дифференцировки Th1	[53]
miR-124	Макрофаги костного мозга	↓	<i>CEBPA, SPI1</i>	Активация фагоцитарной активности, ингибирование дифференцировки микроглии	[47]
miR-132/212	CD4+ Т-лимфоциты	↓	<i>ACHE</i>	Стимуляция Т-клеточной пролиферации, продукции IL-17, IFN-γ; повышение каталитической активности ацетилхолинэстеразы	[54]
miR-146a	Стволовые клетки костного мозга	↑	<i>PTGES2</i>	Ингибирование синтеза простагландина-E2	[45]
miR-155	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>SOCS1</i>	Стимуляция развития клеток Th1 и Th17	[42]
		↑	<i>INPP5D</i>	Нарушение пролиферации миелина	[42]
miR-301a	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>PIAS3</i>	Регуляция дифференцировки Th17	[55]
miR-326	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>ETS1</i>	Стимуляция развития и пролиферации Th17	[56]
miR-873	Первичная культура астроцитов	↑	<i>TNFAIP3</i>	Стимуляция продукции воспалительных цитокинов и усиление демиелинизации нервных волокон	[57]

\*Здесь и далее: повышение (↑) или понижение (↓) экспрессии микроРНК при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

микроРНК в регуляции дифференцировки Th1- и Th17-клеток и синтеза про- и противовоспалительных цитокинов.

### МикроРНК и развитие аутоиммунного воспалительного процесса при РС

В табл. 2 представлены результаты изучения экспрессии микроРНК у больных РС. Для выделения микроРНК использовали различные ткани и клетки: компоненты крови, цереброспинальную жидкость и бляшки демиелинизации. Сравнивали уровни экспрессии микроРНК в контрольной группе здоровых людей и у больных разными формами РС. В группу больных РС входили в основном больные с ремиттирующей формой РС (РРС), клинически изолированным синдромом, первично-прогрессирующей

формой РС, а также больные с вторично-прогрессирующей формой РС. Из табл. 2 видно, что спектр экспрессируемых микроРНК разнообразен и, вероятно, зависит от источника их выделения и/или формы РС.

Изменения в экспрессии некоторых микроРНК наблюдали в разных клетках. Так, экспрессия miR-142-3p, -155 и -326 повышена как в бляшках демиелинизации, так и в цельной крови больных РС; miR-19b и miR-106b – в Treg- и В-клетках, а miR-145 – в цельной крови и в мононуклеарных клетках крови. В случае некоторых микроРНК (miR-17, miR-34a) наблюдались противоположные эффекты в зависимости от типа клеток: в цельной крови отмечена повышенная экспрессия miR-17, а в CD4+ Т-клетках – пониженная; экспрессия miR-34a

Таблица 2. МикроРНК, экспрессия которых изменена при рассеянном склерозе

Источник микроРНК	Форма рассеянного склероза	МикроРНК, дифференциально экспрессирующиеся у больных РС в сравнении с контролем	Изменение экспрессии	Ссылка
Цельная кровь	PPC	miR-142-3p, -145, -186, -223, -442a, -491-5p, -584, -664, -1275	↑	[58]
		miR-20b	↓	
	PPC, КИС	miR-16-2-3p, -574-5p	↑	[59]
		miR-7-1-3p, <b>-20a-5p, -20b</b> , -146b-5p, -3653	↓	
PPC, ППРС, ВПРС	miR-17, -20	↓	[60]	
МНК	PPC	miR-326	↑	[56]
		miR-18b, -193a, -328, -599	↑	[61]
		let-7d, miR-145, -744	↑	[62]
		miR-142-3p, <b>-146a, -155, -326</b>	↑	[63]
	PPC, ППРС, ВПРС	let-7g, miR-150	↓	[64]
PPC, КИС	<b>miR-29a-3p, -29c-3p, -532-5p</b>	↓	[65]	
CD4+ Т-лимфоциты	PPC	miR-326	↑	[56]
		<b>miR-17-5p</b> , -193a, -376a, -485-3p	↑	[66]
		miR-34a, -126, -497	↓	
	PPC, ППРС, ВПРС	miR-27b, -128, -340	↑	[67]
		miR-29b	↑	[53]
CD4+ CD25+ Т-регуляторные лимфоциты	PPC	<b>miR-19a, -19b</b> , -25, -93, -106b	↑	[68]
В-лимфоциты	PPC	<b>miR-19b</b> , -106b, -191, -551a	↑	[69]
Плазма	Не указано	miR-22, -422a, -572, -614, -648, -1826	↑	[70]
		miR-1979	↓	
ЦСЖ*	PPC, ППРС, ВПРС	miR-181c, -633	↑	[71]
		miR-922	↓	
Бляшка демиелинизации**	PPC, ППРС, ВПРС	<b>miR-21, -23a, -27a, -34a, -142-3p, -146a, -155, -199a, -326, -346, -650</b>	↑	[72]

\*В качестве контроля использовали цереброспинальную жидкость пациентов с другими неврологическими заболеваниями.

\*\*Контролем служили срезы белого вещества головного мозга, полученные постмортально от пациентов без неврологических заболеваний.

Примечание. ВПРС – вторично-прогрессирующая форма рассеянного склероза (РС); КИС – клинически изолированный синдром; МНК – мононуклеарные клетки крови; ППРС – первично-прогрессирующая форма РС; PPC – ремиттирующая форма РС; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость. Жирным шрифтом выделены микроРНК, экспрессия которых изменена как при рассеянном склерозе, так и при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

в бляшке была повышена, а в CD4+ Т-клетках – понижена. Ряд изменений (в табл. 2 выделены жирным шрифтом) в экспрессии микроРНК (miR-17, -19, -20, -21, -23, -29, -146, -155, -326) совпадал с данными, полученными на моделях ЭАЭ. Однако во многих случаях наблюдали разные паттерны экспрессии микроРНК, что можно объяснить разными причинами, в том числе условиями проведения экспериментов. Важно отметить, что представленные в табл. 2 данные об уровне экспрессии микроРНК не соотнесены со стадией РС и тактикой лечения больных РС.

В В-клетках и CD4+ Т-клетках выявлены гены-мишени некоторых микроРНК, экспрессия которых изменяется при развитии РС. Эти гены, а также их предполагаемые функции представлены в табл. 3. Ген, кодирующий молекулу клеточной адгезии CD47, служит мишенью для miR-34a, miR-155 и miR-346. Другими мишенями оказались гены, кодирующие регуляторы апоптоза (BIM) и транскрипции (SIRT1), ингибитор клеточной пролиферации (p21) и матриксную металлопротеазу 9 (MMP9), а также цитокин IL-4. Действие микроРНК на эти мишени приводит

**Таблица 3.** мРНК-мишени и возможные механизмы влияния некоторых микроРНК, экспрессия которых изменяется при развитии рассеянного склероза у человека

МикроРНК	Исследуемые клетки	Изменение экспрессии	Гены, кодирующие мРНК-мишени	Предполагаемая функция	Ссылка
miR-17	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>TGFBR2, PTEN, BCL2L11, CDKN1A</i>	Пролиферация и активация Т-клеток	[73]
miR-34a miR-155 miR-346	Бляшка демиелинизации	↑	<i>CD47</i>	Стимуляция фагоцитоза миелина	[72]
miR-132	В-лимфоциты	↑	<i>SIRT1</i>	Повышенная продукция провоспалительных цитокинов	[74]
miR-320a	В-лимфоциты	↓	<i>MMP9</i>	Нарушение проницаемости ГЭБ	[75]
miR-340	CD4+ Т-лимфоциты	↑	<i>IL-4</i>	Сдвиг баланса Th2/Th1-цитокинов в сторону Th1	[67]

к стимуляции фагоцитоза миелина и изменению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а также к нарушению пролиферации и активации Т-клеток и секреции про- и противовоспалительных цитокинов.

Анализ представленных в *табл. 2 и 3* данных указывает на разнообразие профилей дифференциальной экспрессии микроРНК при РС в зависимости от типа анализируемых клеток. Учитывая комплексный характер патологии РС, можно предположить, что экспрессия микроРНК определяет стадии клинического течения РС, однако имеющихся данных явно недостаточно для окончательных выводов. Дальнейшее изучение дифференциальной экспрессии микроРНК может помочь выявить потенциальные биомаркеры РС и характера его течения, а также пролить свет на механизмы действия микроРНК.

Особый интерес представляют пусковые механизмы, которые лежат в основе процессов, обеспечивающих выход пациентов из состояния ремиссии в состояние острого обострения при РС, и из состояния обострения в ремиссию.

В целом, изучение роли микроРНК в эпигенетической регуляции аутоиммунного воспаления при различных воспалительных АИЗ может не только способствовать пониманию процессов поддержания стабильности и пластичности иммунной системы, но и повлиять на развитие стратегий профилактики и лечения этих тяжелых социально значимых заболеваний. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда  
(проект № 14-14-00605).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Rebane A., Akdis C.A. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. V. 132. P. 15–26.
2. Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. // *Nature.* 2000. V. 403. P. 901–906.
3. Kamanu T.K., Radovanovic A., Archer J.A., Bajic V.B. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2940.
4. Eulalio A., Mano M. // *J. Biomol. Screen.* 2015. V. 20. P. 1003–1017.
5. Meunier J., Lemoine F., Soumillon M., Liechti A., Weier M., Guschanski K., Hu H., Khaitovich P., Kaessmann H. // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 34–45.
6. Zhuo Y., Gao G., Shi J.A., Zhou X., Wang X. // *Cell Physiol. Biochem.* 2013. V. 32. P. 499–510.
7. Westholm J.O., Lai E.C. // *Biochimie.* 2011. V. 93. P. 1897–1904.
8. Okamura K., Hagen J., Duan H., Tyler D., Lai E. // *Cell.* 2007. V. 130. P. 89–100.
9. Valinezhad Orang A., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M. // *Int. J. Genomics.* 2014. V. 2014. P. 970607.
10. Vasudevan S. // *WIREs RNA.* 2012. V. 3. P. 311–330.
11. Turchinovich A., Cho W.C. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 30.
12. Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. P. 423–433.
13. Diao L., Marcais A., Norton S., Chen K.C. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. e135.
14. Ainiding G., Kawano Y., Sato S., Isobe N., Matsushita T., Yoshimura S., Yonekawa T., Yamasaki R., Murai H., Kira J., et al. // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 337. P. 147–150.
15. Shivdasani R.A. // *Blood.* 2006. V. 108. P. 3646–3653.
16. Belver L., de Yebenes V.G., Ramiro A.R. // *Immunity.* 2010. V. 33. P. 713–722.
17. Jia S., Zhai H., Zhao M. // *Discov. Med.* 2014. V. 18. P. 237–247.
18. Fazi F., Rosa A., Fatica A., Gelmetti V., De Marchis M.L., Nervi C., Bozzoni I. // *Cell.* 2005. V. 123. P. 819–831.

19. Fontana L., Pelosi E., Greco P., Racanicchi S., Testa U., Liuzzi F., Croce C.M., Brunetti E., Grignani F., Peschle C. // *Nat. Cell. Biol.* 2007. V. 9. P. 775–787.
20. O'Connell R.M., Chaudhuri A.A., Rao D.S., Baltimore D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 7113–7118.
21. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 12481–12486.
22. O'Neill L.A., Sheedy F.J., McCoy C.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. P. 163–175.
23. Zhang N., Bevan M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 21629–21634.
24. Koralov S.B., Muljo S.A., Galler G.R., Krek A., Chakraborty T., Kanellopoulou C., Jensen K., Cobb B.S., Merckenschlager M., Rajewsky N., et al. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 860–874.
25. O'Carroll D., Mecklenbrauker I., Das P.P., Santana A., Koenig U., Enright A.J., Miska E.A., Tarakhovskiy A. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 1999–2004.
26. Bronevetsky Y., Villarino A.V., Eislely C.J., Barbeau R., Barczak A.J., Heinz G.A., Kremmer E., Heissmeyer V., McManus M.T., Erle D.J., et al. // *J. Exp. Med.* 2013. V. 210. P. 417–432.
27. Zhu S., Pan W., Qian Y. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2013. V. 91. P. 1039–1050.
28. Dai R., Ahmed S.A. // *Transl. Res.* 2011. V. 157. P. 163–179.
29. Sethi A., Kulkarni N., Sonar S., Lal G. // *Front. Genet.* 2013. V. 4. P. 8.
30. Baumjohann D., Ansel K.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. V. 13. P. 666–678.
31. Rouas R., Fayyad-Kazan H., El Zein N., Lewalle P., Rothe F., Simion A., Akl H., Mourtada M., El Rifai M., Burny A., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2009. V. 39. P. 1608–1618.
32. Salaun B., Yamamoto T., Badran B., Tsunetsugu-Yokota Y., Roux A., Baitsch L., Rouas R., Fayyad-Kazan H., Baumgaertner P., Devevre E., et al. // *J. Transl. Med.* 2011. V. 9. P. 44.
33. Xiao C., Calado D.P., Galler G., Thai T.H., Patterson H.C., Wang J., Rajewsky N., Bender T.P., Rajewsky K. // *Cell.* 2007. V. 131. P. 146–159.
34. Thai T.H., Calado D.P., Casola S., Ansel K.M., Xiao C., Xue Y., Murphy A., Frenthewey D., Valenzuela D., Kutok J.L., et al. // *Science.* 2007. V. 316. P. 604–608.
35. Hu R., O'Connell R.M. // *Arthritis Res. Ther.* 2013. V. 15. P. 202.
36. Qu Z., Li W., Fu B. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 527895.
37. Singh R.P., Massachi I., Manickavel S., Singh S., Rao N.P., Hasan S., Mc Curdy D.K., Sharma S., Wong D., Hahn B.H., et al. // *Autoimmun. Rev.* 2013. V. 12. P. 1160–1165.
38. Zhu S., Pan W., Song X., Liu Y., Shao X., Tang Y., Liang D., He D., Wang H., Liu W., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. P. 1077–1086.
39. Zhao X., Tang Y., Qu B., Cui H., Wang S., Wang L., Luo X., Huang X., Li J., Chen S., et al. // *Arthritis Rheum.* 2010. V. 62. P. 3425–3435.
40. Perry M.M., Moschos S.A., Williams A.E., Shepherd N.J., Larner-Svensson H.M., Lindsay M.A. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 5689–5698.
41. Stanczyk J., Ospelt C., Karouzakis E., Filer A., Raza K., Kolling C., Gay R., Buckley C.D., Tak P.P., Gay S., et al. // *Arthritis Rheum.* 2011. V. 63. P. 373–381.
42. O'Connell R.M., Kahn D., Gibson W.S., Round J.L., Scholz R.L., Chaudhuri A.A., Kahn M.E., Rao D.S., Baltimore D. // *Immunity.* 2010. V. 33. P. 607–619.
43. Bergman P., James T., Kular L., Ruhrmann S., Kramarova T., Kvist A., Supic G., Gillett A., Pivarcsi A., Jagodic M. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. P. 4066–4075.
44. Lewkowicz P., Cwiklinska H., Mycko M.P., Cichalewska M., Domowicz M., Lewkowicz N., Jurewicz A., Selmaj K.W. // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. P. 7521–7537.
45. Matysiak M., Fortak-Michalska M., Szymanska B., Orłowski W., Jurewicz A., Selmaj K. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. P. 5102–5109.
46. Aggarwal S., Pittenger M.F. // *Blood.* 2005. V. 105. P. 1815–1822.
47. Ponomarev E.D., Veremeyko T., Barteneva N., Krichevsky A.M., Weiner H.L. // *Nat. Med.* 2011. V. 17. P. 64–70.
48. Guan H., Fan D., Mrelashvili D., Hao H., Singh N.P., Singh U.P., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. // *Eur. J. Immunol.* 2013. V. 43. P. 104–114.
49. Liu S.Q., Jiang S., Li C., Zhang B., Li Q.J. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 12446–12456.
50. Zhu E., Wang X., Zheng B., Wang Q., Hao J., Chen S., Zhao Q., Zhao L., Wu Z., Yin Z. // *J. Immunol.* 2014. V. 192. P. 5599–5609.
51. Murugaiyan G., da Cunha A.P., Ajay A.K., Joller N., Garo L.P., Kumaradevan S., Yosef N., Vaidya V.S., Weiner H.L. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. P. 1069–1080.
52. Zhang R., Tian A., Wang J., Shen X., Qi G., Tang Y. // *Neuromol. Med.* 2015. V. 17. P. 24–34.
53. Smith K.M., Guerau-de-Arellano M., Costinean S., Williams J.L., Bottoni A., Mavrikis Cox G., Satskar A.R., Croce C.M., Racke M.K., Lovett-Racke A.E., et al. // *J. Immunol.* 2012. V. 189. P. 1567–1576.
54. Hanieh H., Alzahrani A. // *Eur. J. Immunol.* 2013. V. 43. P. 2771–2782.
55. Mycko M.P., Cichalewska M., Machlanska A., Cwiklinska H., Mariasiewicz M., Selmaj K.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E1248–1257.
56. Du C., Liu C., Kang J., Zhao G., Ye Z., Huang S., Li Z., Wu Z., Pei G. // *Nat. Immunol.* 2009. V. 10. P. 1252–1259.
57. Liu X., He F., Pang R., Zhao D., Qiu W., Shan K., Zhang J., Lu Y., Li Y., Wang Y. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 28971–28986.
58. Keller A., Leidinger P., Lange J., Borries A., Schroers H., Scheffler M., Lenhof H.P., Ruprecht K., Meese E. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e7440.
59. Keller A., Leidinger P., Steinmeyer F., Stahler C., Franke A., Hemmrich-Stanisak G., Kappel A., Wright I., Dorr J., Paul F., et al. // *Mult. Scler.* 2014. V. 20. P. 295–303.
60. Cox M.B., Cairns M.J., Gandhi K.S., Carroll A.P., Moscovis S., Stewart G.J., Broadley S., Scott R.J., Booth D.R., Lechner-Scott J., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e12132.
61. Otaegui D., Baranzini S.E., Armananzas R., Calvo B., Munoz-Culla M., Khankhanian P., Inza I., Lozano J.A., Castillo-Trivino T., Asensio A., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e6309.
62. Sondergaard H.B., Hesse D., Krakauer M., Sorensen P.S., Sellebjerg F. // *Mult. Scler.* 2013. V. 19. P. 1849–1857.
63. Waschbisch A., Atiya M., Linker R.A., Potapov S., Schwab S., Derfuss T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e24604.
64. Martinelli-Boneschi F., Fenoglio C., Brambilla P., Sorosina M., Giacalone G., Esposito F., Serpente M., Cantoni C., Ridolfi E., Rodegher M., et al. // *Neurosci. Lett.* 2012. V. 508. P. 4–8.
65. Hecker M., Thamilarasan M., Koczan D., Schroder I., Flechtner K., Freiesleben S., Fullen G., Thiesen H.J., Zettl U.K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 16087–16110.
66. Lindberg R.L., Hoffmann F., Mehling M., Kuhle J., Kappos L. // *Eur. J. Immunol.* 2010. V. 40. P. 888–898.
67. Guerau-de-Arellano M., Smith K.M., Godlewski J., Liu Y., Winger R., Lawler S.E., Whitacre C.C., Racke M.K., Lovett-Racke A.E. // *Brain.* 2011. V. 134. P. 3578–3589.
68. De Santis G., Ferracin M., Biondani A., Caniatti L., Rosaria Tola M., Castellazzi M., Zagatti B., Battistini L., Borsellino G., Fainardi E., et al. // *J. Neuroimmunol.* 2010. V. 226. P. 165–171.

69. Sievers C., Meira M., Hoffmann F., Fontoura P., Kappos L., Lindberg R.L. // *Clin. Immunol.* 2012. V. 144. P. 70–79.
70. Siegel S.R., Mackenzie J., Chaplin G., Jablonski N.G., Griffiths L. // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. P. 6219–6225.
71. Haghikia A., Haghikia A., Hellwig K., Baraniskin A., Holzmann A., Decard B.F., Thum T., Gold R. // *Neurology.* 2012. V. 79. P. 2166–2170.
72. Junker A., Krumbholz M., Eisele S., Mohan H., Augstein F., Bittner R., Lassmann H., Wekerle H., Hohlfeld R., Meinl E. // *Brain.* 2009. V. 132. P. 3342–3352.
73. Meira M., Sievers C., Hoffmann F., Rasenack M., Kuhle J., Derfuss T., Kappos L., Lindberg R.L. // *J. Immunol. Res.* 2014. V. 2014. P. 897249.
74. Miyazaki Y., Li R., Rezk A., Misirliyan H., Moore C., Farooqi N., Solis M., Goiry L.G., de Faria Junior O., Dang V.D., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e105421.
75. Aung L.L., Mouradian M.M., Dhib-Jalbut S., Balashov K.E. // *J. Neuroimmunol.* 2015. V. 278. P. 185–189.

УДК 578.233.44

# Клеточные белки Ku и HMGA1 как участники транскрипции ВИЧ-1

О. А. Шадрина<sup>1</sup>, Е. С. Княжанская<sup>2</sup>, С. П. Королев<sup>2</sup>, М. Б. Готтих<sup>3\*</sup>

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

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

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

\*E-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 17.07.2015

Принята к печати 28.10.2015

**РЕФЕРАТ** Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) использует транскрипционную машину клетки-хозяина для транскрипции своих генов. Единственным вирусным белком, участвующим в этом процессе, является трансактиватор транскрипции Tat. В острой фазе инфекции Tat связывается с РНК-шпилькой в начале транскрибируемой вирусной РНК и привлекает комплекс Р-TEFb, который гиперфосфорилирует РНК-полимеразу II и запускает элонгацию транскрипции. Латентная фаза ВИЧ-инфекции характеризуется низким уровнем транскрипции. В латентной фазе и при выходе из нее белок Tat в клетке не детектируется, и механизм активации транскрипции в его отсутствие понятен не до конца. Актуальным остается вопрос о механизме поддержания латентности. Очевидно, что и в репрессии транскрипции в латентной фазе, и в ее активации при переходе в литическую фазу инфекции участвуют клеточные белки, роль которых еще не выяснена. Данный обзор посвящен обсуждению роли клеточных белков Ku и HMGA1 в инициации и элонгации транскрипции интегрированного генома ВИЧ-1. Представлены данные о зависимости Ku-опосредованной транскрипции ВИЧ-1 от структуры промотора и формы вирусной ДНК. Описано разнонаправленное влияние белка HMGA1 на индуцируемую транскрипцию и на базальную транскрипцию ВИЧ-1. Предложены возможные механизмы участия белков Ku и HMGA1 в регуляции транскрипции про-вируса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клеточные факторы транскрипции, латентная фаза, транскрипция ВИЧ-1, элонгация.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; TAR (trans-activation response) – элемент трансактивируемого ответа; Tat (trans-activator of transcription) – трансактиватор транскрипции; HMGA1 (high mobility group protein A1) – белок A1 группы с высокой подвижностью; DNA-РК – ДНК-зависимая протеинкиназа; DNA-РКcs – каталитическая субъединица DNA-РК; LTR – длинный концевой повтор; РНКП II – ДНК-зависимая РНК-полимераза II; СКД РНКП II – С-концевой домен РНКП II; Р-TEFb (positive transcription elongation factor b) – позитивный фактор b элонгации транскрипции; HTLV-1 – Т-лимфотропный вирус человека; MMTV – вирус опухоли молочной железы мыши; NRE-1 (negative regulatory element 1) – негативный регуляторный элемент 1; ТФ – транскрипционный фактор.

## ВВЕДЕНИЕ

Прошло уже более 30 лет после открытия вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), но вызываемую им инфекцию до сих пор не удалось победить. Высокоактивная антиретровирусная терапия, применяемая при ВИЧ-инфекции, позволила значительно уменьшить смертность больных СПИДом, однако прерывание терапии неизбежно приводит к возобновлению репродукции вируса и повышению его титра в крови. Одной из причин этого является

присутствие в организме человека клеток, содержащих интегрированный в их геном «спящий» провирус. «Спящее» состояние, типичное для латентной стадии вирусной инфекции, характеризуется отсутствием полноценной транскрипции с вирусного промотора. Однако «спящий» провирус может активироваться и при отсутствии терапии вызвать развитие СПИДа [1].

В активной транскрипции с промотора ВИЧ-1 особую роль играет расположенная на 5'-конце синте-

зируемой мРНК шпилечная структура, называемая TAR (trans-activation response). После интеграции вирусной кДНК в геном клетки-хозяина элонгация транскрипции вирусного генома происходит только после связывания TAR с вирусным регуляторным белком Tat (trans-activator of transcription) [2]. Формирование комплекса TAR-Tat обеспечивает фосфорилирование РНК-полимеразы II, необходимое для снятия транскрипционного блока и перехода в стадию элонгации [3]. Однако в латентном состоянии вируса белок Tat в клетке не детектируется, и механизм процесса активации транскрипции «спящего» интегрированного провируса при переходе из латентной в литическую фазу жизненного цикла ВИЧ-1 понятен не до конца. Изучение белков, участвующих в активации транскрипции с промотора ВИЧ-1 по Tat-независимому механизму, очень актуально, поскольку в перспективе позволит понять механизм перехода вируса из латентной фазы в литическую и найти подходы к регуляции этого процесса.

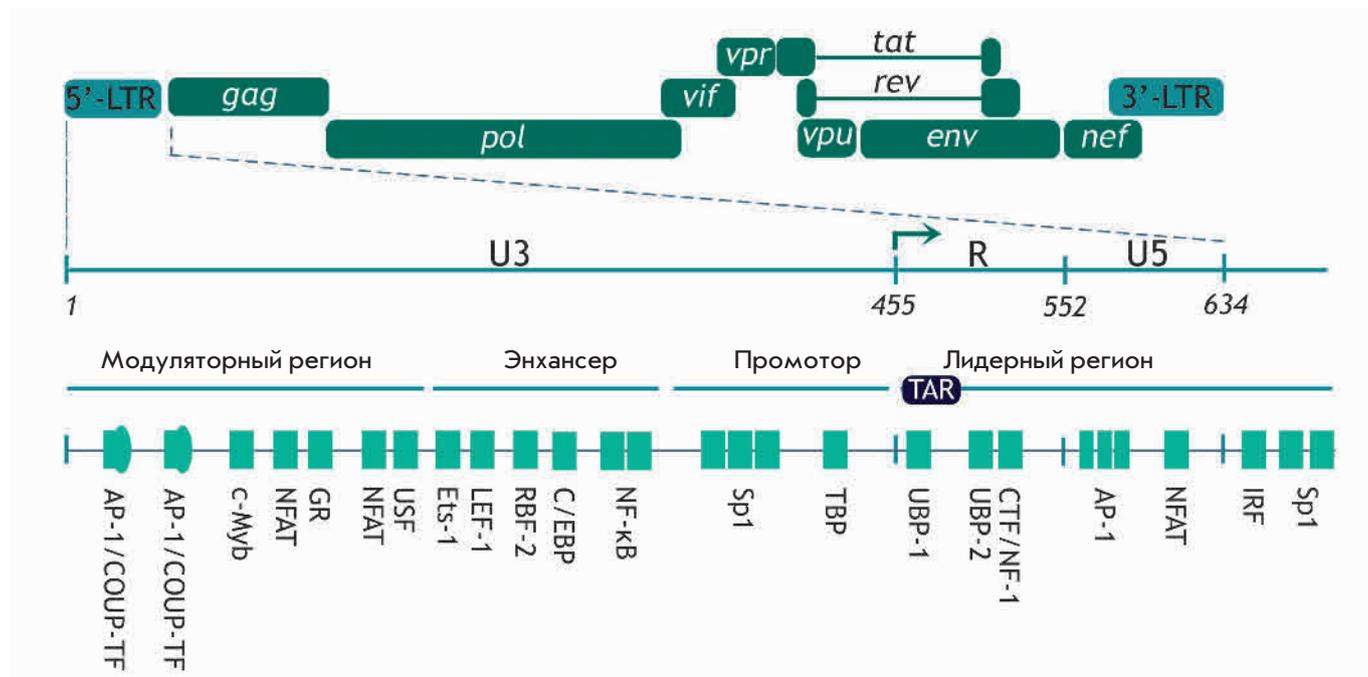
Недавние исследования показали, что в регуляции уровня транскрипции с промотора ВИЧ-1 в латентной фазе (базальной транскрипции) может принимать участие клеточный белок HMG A1 [4, 5]. Еще одним участником регуляции транскрипции может быть клеточный ДНК-связывающий белок Ku – компонент ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK)

[6–10]. В представленном обзоре суммированы данные о влиянии белков Ku и HMG A1 на транскрипцию ВИЧ-1, приведены также возможные схемы участия этих белков на регуляцию транскрипции.

### РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ С ПРОМОТОРА ВИЧ-1

Вирус иммунодефицита человека первого типа принадлежит к роду лентивирусов семейства ретровирусов. Он поражает иммунную систему организма человека и вызывает синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Геном ВИЧ-1, как и у других лентивирусов, представлен молекулой РНК, на основе которой вирусный фермент обратная транскриптаза синтезирует ДНК-копию генома, которая затем встраивается в геном клетки с образованием провирусной ДНК. Однако большая доля вирусной ДНК остается неинтегрированной [11]. Такая ДНК существует главным образом в кольцевой форме. С кольцевых форм вирусной ДНК может осуществляться транскрипция, но основной матрицей для синтеза вирусных белков служит именно интегрированная форма провируса [12].

После интеграции в хромосому зараженной клетки вирусная ДНК может оставаться в «молчащем» состоянии или активно транскрибироваться. Иными словами, транскрипция может идти малыми темпами с образованием небольшого числа транскрип-



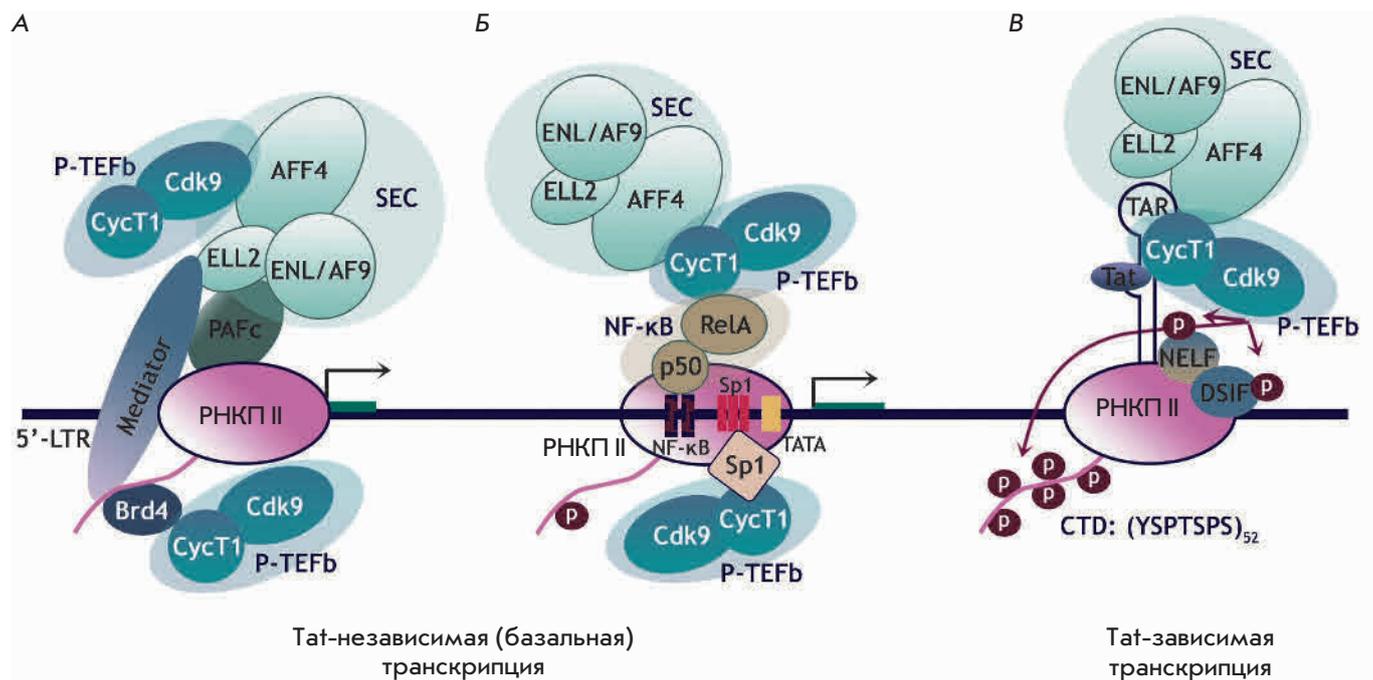
**Рис. 1.** Сайты связывания транскрипционных факторов в 5'-LTR ВИЧ-1. Схематичное представление провируса ВИЧ-1 и основных сайтов связывания факторов транскрипции. Указано положение регионов 5'-LTR: U3 (нуклеотиды 1–455), R (456–552), U5 (553–634). Старт транскрипции показан стрелкой и соответствует границе регионов U3 и R. По данным [13]

тов без быстрого прогрессирования инфекции – это базальная, ничем не активируемая транскрипция. Другой вариант – активное протекание транскрипции с образованием большого количества РНК и новых вирусных частиц. Регуляция транскрипции генома ВИЧ-1, лежащая в основе изменения состояния провируса, зависит от большого набора различных факторов: цис-элементов вирусной ДНК, клеточных транскрипционных факторов, вирусного трансактиватора Tat, степени конденсации хроматина.

Вирусная ДНК, интегрированная в клеточный геном, содержит на своих концах длинные концевые повторы (LTR). Каждый из них состоит из трех регионов: U3, R, U5 (рис. 1). Транскрипция начинается на границе U3 и R в 5'-LTR; в регионе U3 располагаются вирусный промотор, узнаваемый РНК-полимеразой II (РНКП II), и некоторые регуляторные элементы. В 5'-LTR выделяют четыре функциональных региона, участвующих в регуляции транскрипции генома ВИЧ-1: модуляторный регион, энхансер, промотор и лидерный регион (рис. 1) [13]. Они содержат множество сайтов связывания клеточных факторов транскрипции, в том числе наиболее важных для регуляции транскрипции с вирусного промотора – NF-κB, NFAT, Sp1,

AP-1 (рис. 1). Эти факторы участвуют в инициации транскрипции [1, 13].

Переход провируса из молчащего состояния в активное начинается с инициации транскрипции. При этом синтезируются короткие abortивные транскрипты длиной около 60–80 нуклеотидов [14], которые образуют на 5'-конце стабильную шпильку, называемую TAR. После синтеза TAR РНК наступает пауза: РНКП II останавливается, поскольку с ней связаны факторы, репрессирующие элонгацию – NELF (negative elongation factor) и DSIF (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor) [15]. Для продолжения транскрипции и перехода в стадию активной элонгации необходимо гиперфосфорилирование С-концевого домена (СКД) РНКП II по остаткам Ser2 в гептапептидных повторах YSPTSPS. Оно обеспечивается фактором элонгации транскрипции P-TEFb (positive transcription elongation factor b), состоящим из циклинзависимой киназы 9 (Cdk9) и циклина T1 (CycT1). В клетках уровень P-TEFb регулируется связыванием с малым ядерным рибонуклеопротеином 7SK (7SK мяРНП), который ингибирует киназную активность фактора P-TEFb и препятствует элонгации транскрипции [16].



**Рис. 2.** Возможные пути привлечения P-TEFb к промотору ВИЧ-1. А, Б – Tat-независимая транскрипция, при которой P-TEFb стимулирует базальную транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в отсутствие Tat. P-TEFb может привлекаться клеточными белками Brd4, SEC (А) или NF-κB, Sp1 (Б). В – Tat-зависимая транскрипция. Tat связывается с TAR РНК, способствует освобождению P-TEFb из 7SK мяРНП и привлечению его к остановленному элонгационному комплексу. По данным [14]

Главным регулятором на стадии элонгации выступает вирусный белок Tat, который на порядок увеличивает эффективность синтеза РНК [2]. Связывание Tat с синтезированной РНК TAR способствует диссоциации Р-TEFb из комплекса с 7SK мяРНК и привлекает его к вирусному промотору. В результате Р-TEFb обеспечивает гиперфосфорилирование РНКП II, а также факторов NELF и DSIF [17]. Фосфорилирование DSIF превращает его в активирующий фактор элонгации, а фосфорилированная форма NELF диссоциирует из транскрипционного комплекса, позволяя РНКП II вести эффективную элонгацию и синтезировать полноразмерные мРНК (рис. 2) [3].

Однако на латентной стадии инфекции Tat не детектируется в клетке, его нет и в начале выхода провируса из «спящего» состояния. В ряде случаев формирование комплекса TAR-Tat-P-TEFb невозможно из-за мутаций, нарушающих взаимодействие между компонентами комплекса [18]. Тем не менее все же существует возможность транскрипции с промотора ВИЧ-1. Известно несколько возможных механизмов Tat-независимой активации транскрипции. Во-первых, предполагается, что Р-TEFb осуществляет необходимое для элонгации транскрипции фосфорилирование СКД РНКП II в отсутствие Tat [19]. При этом в привлечении Р-TEFb на вирусный промотор участвуют, по-видимому, некоторые клеточные факторы (Sp1 [20], SEC [14], Brd4 [21, 22], NF-κB [14]) (рис. 2А,Б). Другая возможность – связывание с промотором ВИЧ-1 другого клеточного белка, отличного от Р-TEFb, который может фосфорилировать СКД РНКП II и репрессирующие факторы NELF и DSIF.

Несмотря на большой объем информации о регуляции транскрипции ВИЧ-1 и участии в ней различных клеточных факторов, остается много не до конца понятных моментов. В частности, есть два клеточных белка, участвующих в транскрипции ВИЧ-1, роль которых в этом процессе не вполне ясна. Это белки Ku и HMGAl. Существуют данные как об их положительной роли в регуляции транскрипции, так и об отрицательной. Тем не менее точные механизмы участия этих белков в транскрипции ВИЧ-1 до сих пор не установлены.

### УЧАСТИЕ Ku В ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1

Белок Ku – это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц массой примерно 70 и 80 кДа, известных как Ku70 (p70) и Ku80 (Ku86, p80). Эти белки кодируются генами *xrcc6* (Ku70) и *xrcc5* (Ku80). Большинство своих функций в клетке Ku выполняет именно в виде очень прочного гетеродимера [23]. Однако существуют исследования, показывающие,

что в некоторых процессах могут действовать изолированные субъединицы Ku70 и Ku80 [24].

Гетеродимер Ku70/Ku80 – ДНК-связывающий белок, взаимодействующий преимущественно со свободными концами двухцепочечной ДНК, биологические функции которого связаны, в основном, именно с этой его особенностью. Взаимодействие гетеродимера Ku с ДНК довольно прочное – величина  $K_d$  варьирует в пределах  $1.5-4.0 \times 10^{-10}$  М [25]. Судя по данным рентгеноструктурного анализа [26], Ku70 и Ku80 в составе гетеродимера образуют асимметричное кольцо с широким основанием и тонким мостиком, и в образуемый белком канал помещается ДНК (рис. 3). Канал состоит преимущественно из положительно заряженных аминокислотных остатков, взаимодействующих с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом молекулы ДНК, что объясняет способность Ku связываться с ДНК независимо от ее нуклеотидной последовательности. После связывания с концом ДНК Ku может перемещаться («скользить») по ней, останавливаясь на некоторых последовательностях [25, 27].

Наиболее известная и изученная биологическая функция Ku – участие в репарации двухцепочечных разрывов в ДНК путем негомологичного объединения концов (nonhomologous end joining – NHEJ). Ku также участвует в таких клеточных процессах, как V(D) J-рекомбинация, перестановка мобильных элементов генома, поддержание длины теломер, апоптоз, транскрипция [28, 29]. Одна из важных функций Ku – связывание с каталитической субъединицей DNA-РКс и формирование ДНК-зависимой протеинкина-

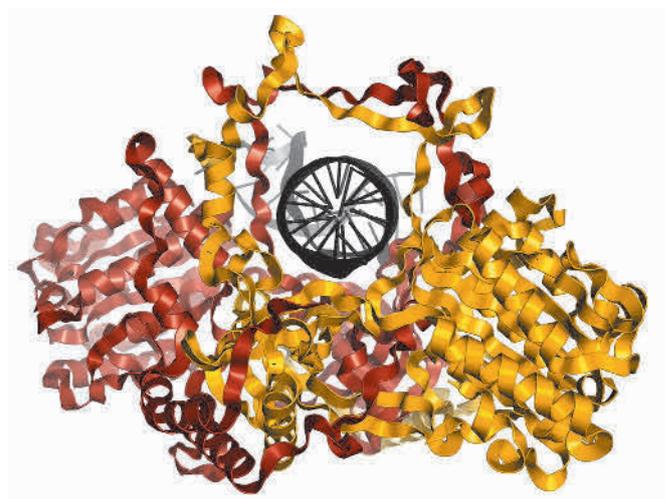


Рис. 3. Структура гетеродимера Ku в комплексе с ДНК по данным [26]. ДНК (показана черным) погружается в канал, образуемый петлями Ku70 (желтый) и Ku80 (коричневый). PDB ID 1JEY

зы DNA-РК. Важно отметить, что каталитическая функция DNA-РК активируется после связывания с ДНК, за которое отвечает гетеродимер Ku [25].

### Возможные механизмы Ku-опосредованной регуляции транскрипции

Одна из многих функций Ku – участие в регуляции транскрипции. Описано несколько механизмов, с помощью которых Ku может активировать или подавлять транскрипцию. *Первый* из них – это прямое, специфичное к нуклеотидной последовательности, взаимодействие Ku с промоторной областью генов. Предполагается, что с помощью такого механизма регулируется транскрипция клеточных генов *c-Myc*, *Hsp70* [30], U1 мяРНК [31], а также ретровирусов HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus) [32] и MMTV (mouse mammary tumor virus) [33]. Механизм связывания Ku с промотором без участия концов ДНК пока непонятен, однако существуют некоторые данные о возможном специфичном к последовательности взаимодействии гетеродимера с определенным Ku-связывающим сайтом в ДНК [34].

В районе LTR ретровируса MMTV в области NRE-1 (negative regulatory element 1) идентифицирована последовательность, связывание Ku с которой считается истинно специфичным к последовательности и более предпочтительным, чем связывание с концами ДНК (рис. 4) [34]. Взаимодействие Ku с этой последовательностью снижает эффективность транскрипции с вирусного LTR. Предполагается, что в этой регуляции участвует каталитическая субъединица DNA-РКс [33, 35]. Показано, что два фактора транскрипции, связывающиеся с 5'-LTR MMTV и активирующие его транскрипцию, могут быть фосфорилированы DNA-РК *in vitro*: GR (глюкокортикоидный рецептор) [34] и Oct-1 [36]. Возможно, специфичное привлечение DNA-РК на промотор и последующее фосфорилирование факторов транскрипции представляют собой один из механизмов регуляции транскрипции.

В работе [34] указаны все предложенные на тот момент участки связывания Ku в промоторах, гомологичные последовательности NRE-1 в промоторе GR-штамма вируса MMTV (рис. 4). Сообщается, что только эти последовательности способны прямо и специфически взаимодействовать с гетеродимером Ku в отсутствие свободных концов ДНК.

*Второй механизм*, с помощью которого Ku влияет на транскрипцию, это его непосредственное взаимодействие с транскрипционными факторами, включая Oct-1, Oct-2 [36], NF45/NF90 [37], AP-1 [38], E2f-1 [39], YY1 [40], p53 [41]. Некоторые из этих факторов вовлечены в регуляцию транскрипции ВИЧ-1. Кроме того, как уже упоминалось, некоторые транскрипционные факторы могут служить субстратом для DNA-РК *in vitro*. Способность DNA-РК взаимодействовать как с транскрипционными факторами, так и с целым рядом ядерных рецепторов (AR [42], GR [34], PR [43], ER-α [44]), возможно, предполагает существование некоего общего пути участия Ku в передаче клеточных сигналов и регуляции транскрипции.

Ku может опосредованно регулировать транскрипцию генов, влияя на экспрессию других факторов транскрипции. Так, в клеточной линии AGS Ku действует как положительный регулятор экспрессии гена субъединицы p50 фактора NF-κB [45]. Ku80 стимулирует также экспрессию гена *c-jun*, компонента транскрипционного фактора AP-1 [38]. Стоит заметить, что NF-κB и AP-1 являются важнейшими регуляторами транскрипции генов ВИЧ-1.

Субъединицы Ku70 и Ku80 могут по-разному влиять на транскрипцию. Так, показано, что субъединицы гетеродимера Ku динамически связываются с промотором гена интерлейкина 2 (IL-2) и взаимодействуют с фактором NF45/NF90 в ответ на активацию Т-лимфоцитов [37]. Эта активация приводила к повышению количества комплекса Ku80/NF90, связанного с последовательностью ARRE (antigen receptor response element) в промоторе гена *IL-2*, а количество субъединицы Ku70, связанной с этим участком, при этом снижалось [37]. Однако в другой работе репрессирующую роль Ku в транскрипции гена *Hsp70* связывают с субъединицей Ku70, но не Ku80 [30].

*Третий механизм* транскрипционной регуляции – прямое взаимодействие гетеродимера Ku или его субъединицы Ku80 с холоферментом РНКП II. Обнаружено, что в ядре Ku80 колокализуется с сайтами элонгации транскрипции [46, 47]. В экспериментах по коиммунопреципитации показано взаимодействие Ku с элонгационной формой РНКП II, а также с факторами транскрипции, специфичными для стадии элонгации, в частности DSIF. Также установлено, что во взаимодействии с этими белками ключевую роль играет С-концевой домен Ku80

-396	-	CTGAGAAAGAGAAAGACGACA	-	-376	GR MMTV LTR
-396	-	CTcAagAAGAAAAAAGACGACA	-	-376	СЗН MMTV LTR
-292	-	tacAGAAAGgGAAAGggacta	-	-268	c-мус PRE
292	-	gaatGAAAGgGAAAGggGtggtg	-	269	U5 HTLV LTR

Рис. 4. Предполагаемые Ku-связывающие сайты в промоторах генов. Ku-связывающие сайты, гомологичные последовательности NRE-1, находящейся в LTR GR-штамма MMTV. Цветом выделена последовательность прямого повтора. Несовпадения показаны строчными буквами. По данным [34]

[48]. Отметим, что *in vitro* РНКП II может служить субстратом для DNA-РК [49], однако роль фосфорилирования в регуляции транскрипции пока неясна.

Четвертый способ участия Ku в регуляции транскрипции связан с его основной функцией в репарации двухцепочечных разрывов ДНК [50]. Для успешной инициации транскрипции с ряда промоторов, регулируемых связыванием с AP-1 и ядерными рецепторами (среди которых есть и взаимодействующие с Ku), необходимо внесение двухцепочечных разрывов с помощью ДНК-топоизомеразы IIβ. Тогда в присутствии комплекса белков PARP-1 (poly[adenosinediphosphate (ADP)-ribose]-polymerase-1), DNA-РКcs и Ku70/Ku80 происходит репарация этих разрывов и локальные изменения в структуре хроматина.

Таким образом, в регуляции транскрипции могут участвовать разные субъединицы гетеродимера по отдельности, гетеродимер в целом, а также его комплекс с каталитической субъединицей DNA-РКcs. Общего механизма действия Ku не выявлено, скорее всего, для каждого конкретного гена существует свой способ Ku-зависимой регуляции. Стоит отметить еще раз, что Ku может выступать и как активатор, и как супрессор; его действие часто зависит от набора субъединиц, вовлеченных в регуляцию. Очевидно, в Ku-зависимой регуляции транскрипции не всегда участвует каталитическая субъединица DNA-РК, однако в определенных случаях ее способность к ДНК-зависимому фосфорилированию факторов транскрипции и самой РНКП II может быть ключевым элементом регуляции.

### Роль Ku в транскрипции ВИЧ-1

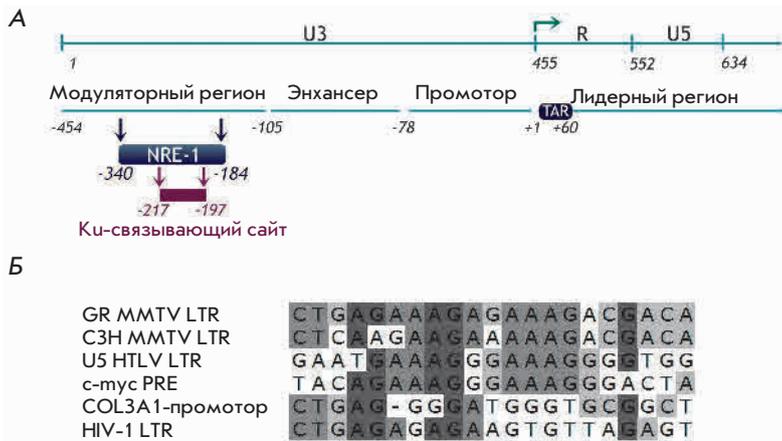
Важность Ku для поддержания жизненного цикла ВИЧ-1 показана в многочисленных исследованиях. Субъединица Ku70 является частью прединтеграционного комплекса и взаимодействует с интегразой ВИЧ-1 [51, 52]. Субъединица Ku80 обнаружена в составе вириона [53], куда может включаться на стадии формирования новой вирусной частицы в ранее зараженной клетке. Известно, что для успешной интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина необходимо репарировать одноцепочечные разрывы, которые образуются при встраивании вирусной ДНК в клеточную. Считается, что в этом процессе могут участвовать белки из системы NHEJ, в частности, гетеродимер Ku70/Ku80 [54]. Так, в клетках, дефектных по Ku80, DNA-РКcs, Xrcc4 (X-ray repair cross-complementing protein 4) и ДНК-лигазе IV, существенно снижена эффективность трансдукции лентивирусных векторов [55, 56]. Ku участвует также в формировании кольцевой формы вирусной ДНК из неинтегрированной линейной ДНК [57–59].

Первые сведения об участии Ku в регуляции транскрипции ВИЧ-1 были получены в начале 2000-х гг. Однако до сих пор нет четкой картины того, как осуществляется эта регуляция. Получены данные в пользу как положительного, так и отрицательного влияния Ku на транскрипцию генома ВИЧ-1.

Впервые роль Ku в транскрипции с вирусного 5'-LTR начали изучать на линии клеток xrs-6, варианте клеток CHO-K1 (клетки яичников китайских хомячков), в которых не экспрессируется ген *Ku80*. В этих клетках наблюдали повышение экспрессии с плазмиды, содержащей ген *CAT* (хлорамфеникол-ацетилтрансфераза) под контролем вирусного промотора из 5'-LTR [6]. Стабильная трансфекция клеток xrs-6 вектором, несущим ген *Ku80* человека, приводила к снижению экспрессии *CAT*. Таким образом, *Ku80* негативно влияет на транскрипцию с 5'-LTR-промотора ВИЧ-1. Отрицательная роль *Ku80* подтверждена на линии клеток U1 человека, содержащей в геноме интегрированный провирус и служащей моделью латентного состояния ВИЧ-1. Оказалось, что снижение количества эндогенного *Ku80* в клетке приводит к повышению уровня транскрипции генов ВИЧ-1 – как базального, так и индуцированного воздействием TNFα.

Учитывая, что Ku негативно влияет на транскрипцию с других ретровирусных промоторов (MMTV, HTLV-1) [32, 33], провели поиск Ku-связывающего сайта в 5'-LTR ВИЧ-1 и обнаружили в области NRE-1 участок (-217/-197), который обладает достаточно высоким сходством с Ku-связывающим сайтом в NRE-1 MMTV (рис. 5) [6]. Были предложены несколько вариантов подавления транскрипции ВИЧ-1 с помощью Ku. Принимая во внимание, что Ku может связываться с факторами транскрипции Oct-1 и Oct-2 [36], которые репрессируют и базальную, и Tat-активированную транскрипцию ВИЧ-1, предположили [6], что связывание Ku в модуляторном регионе (рис. 5A) способствует привлечению этих факторов к промотору ВИЧ-1. Не исключена также возможность участия Ku в регуляции структуры хроматина. NRE-1 содержит сайт связывания ядерного матрикса [60], который перекрывается с предсказанным Ku-связывающим сайтом. Возможно, взаимодействие Ku и ядерного матрикса на этом участке препятствует транскрипции, активируемой NF-κB.

В следующей работе этой же группы [7] сообщалось об отрицательном влиянии *Ku80* на транскрипцию с ретровирусных векторов. При этом оказалось, что независимо от использованного в лентивирусной системе промотора, транскрипция с него была активнее в отсутствие *Ku80*. Иными словами, влияние *Ku80* на экспрессию ретровирусных векторов оказалось неспецифичным к последовательности и, сле-



**Рис. 5.** Схема генома ВИЧ-1 и положение Ku-связывающего сайта в 5'-LTR. А — указано положение регионов 5'-LTR: U3 (нуклеотиды 1–455), R (456–552), U5 (553–638). Отсчет от начала генома. Показаны основные регуляторные регионы 5'-LTR. +1 — отсчет от старта транскрипции, указанного стрелкой. Показан предсказанный в [6] Ku-связывающий сайт. Б — выравнивание между предполагаемыми Ku-связывающими сайтами в регионе NRE-1 ВИЧ-1 и MMTV, а также некоторыми другими последовательностями, похожими на NRE-1 MMTV. По данным [6]

довательно, Ku-связывающий сайт, предложенный в [6], не мог полностью объяснить механизм отрицательной регуляции транскрипции. Отмечено также, что Ku80 не влияет на эффективность трансдукции и интеграции лентивирусных векторов. Вместе с тем, Ku-зависимая регуляция не наблюдалась при использовании в качестве матрицы не псевдотипированного вируса, а плазмидных векторов с теми же промоторами. Предполагается, что Ku80 не прямо влияет на транскрипцию, а направляет интеграцию лентивирусных векторов в транскрипционно неактивные регионы.

В противоположность результатам, приведенным выше, в линиях клеток MAGI и СЕМ-Т4 человека Ku играет положительную роль в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 [8]. Более того, введение в клетки siРНК, направленных против Ku80, приводило к снижению эффективности интеграции вирусного генома в ДНК зараженной клетки, а также к нарушению Tat-TAR-трансактиваии.

Положительное влияние гетеродимера Ku на транскрипцию генома ВИЧ-1 отмечено и в работе [9], в которой использовали клетки человека линии НСТ 116 дикого типа и их вариант *Ku80<sup>+/-</sup>*, трансдуцированные лентивирусными векторами на основе ВИЧ-1. Предварительно было показано, что в клетках НСТ 116 *Ku80<sup>+/-</sup>*, содержание Ku80 в которых снижено в 2 раза, понижен также уровень Ku70. Оказалось, что двукратное снижение уровня эндогенного Ku в клетках приводит к снижению эффективности вирусной транскрипции. Важно отметить, что, в отличие от данных [7], этот эффект был специфичен для вирусного LTR, поскольку изменение уровня гетеродимера Ku не влияло на транскрипцию с других промоторов. Кроме того, оказалось, что в опосредованной Ku регуляции транскрипции не участвуют вирусные белки, и эффект Ku не за-

висит от Tat-трансактиваии. Влияние Ku на транскрипцию было заметно и в присутствии Tat, однако более ярко эффект Ku проявлялся при базальном уровне транскрипции с неактивированного провируса, когда Tat в клетке не детектируется. Интересно, что Ku влияет на базальную транскрипцию ВИЧ-1 только на начальных сроках после интеграции вирусного генома, и снижение уровня Ku в клетках способствует установлению и поддержанию латентности вируса.

Известно, что Ku80 включается в вирион при его сборке [53]. Следовательно, на транскрипцию провируса в зараженной клетке может влиять как эндогенный Ku80, так и Ku80, пришедший из вириона, поэтому, чтобы исключить влияние последнего, лентивирус собирали в клеточной линии с пониженным содержанием гетеродимера Ku [9]. Оказалось, что на транскрипцию в клетке-мишени влияет именно эндогенный Ku.

Стоит отметить, что участие предсказанного ранее Ku-связывающего сайта в 5'-LTR ВИЧ-1 в Ku-опосредованной регуляции транскрипции провируса было опровергнуто также в работе [9]. Замена этого сайта на случайную последовательность не влияла на Ku-зависимую регуляцию транскрипции.

Еще один важный момент данной работы — отсутствие влияния Ku на транскрипцию с кольцевых форм вирусной ДНК. Учитывая, что согласно [7], Ku не влиял на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в составе плазмидного вектора, можно сделать вывод, что Ku стимулирует транскрипцию только с провируса, интегрированного в геном.

Необходимо отдельно отметить работу [10], в которой изучено возможное участие в регуляции транскрипции ВИЧ-1 не только гетеродимера Ku70/Ku80, а всей ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-РК. Эксперименты проводили на клетках ли-

нии Jurkat-E4, ДНК которых несла интегрированный геном ВИЧ-1 и служила моделью лимфоцитов в латентной фазе инфекции. Оказалось, что на промоторе ВИЧ-1 присутствует DNA-РК, причем ее расположение коррелирует с положением РНКП II. Также установлено, что при активации транскрипции значительно повышается количество DNA-РК и РНКП II не только на промоторе, но и в большей степени на транскрибируемой области генома.

Показано также [10], что DNA-РК может фосфорилировать С-концевой домен РНКП II. Более того, в экспериментах *in vitro* установлено, что DNA-РК фосфорилирует преимущественно Ser2, а не Ser5 или Ser7 в гептапептидных повторах YSPTSPS. Учитывая, что именно фосфорилирование Ser2 необходимо для активации элонгации, предположили, что участие DNA-РК может быть важным, в первую очередь, на стадии элонгации транскрипции. Возможно, на промоторе ВИЧ-1 DNA-РК взаимодействует непосредственно с РНКП II, и именно DNA-РК может действовать как фактор, который фосфорилирует полимеразу и снимает элонгационный блок. Так или иначе, параллельное распределение DNA-РК и РНКП II вдоль провируса и их одновременное рекрутирование в ответ на активацию транскрипции позволяют предположить, что DNA-РК (и Ku как ее составная часть) входит в состав большого транскрипционного комплекса, вовлеченного в экспрессию генов ВИЧ-1.

Помимо этого, показано, что DNA-РК положительно влияет на транскрипцию с 5'-LTR ВИЧ-1 и лентивирусных векторов [10]. Нокдаун каталитической субъединицы DNA-РК в клетках Jurkat приводит к значительному снижению экспрессии генов, находящихся под контролем LTR, и незначительно влияет на экспрессию с другого промотора (CMV). Таким образом, нокдаун как DNA-РКcs [10], так и Ku80 [9] приводит к снижению уровня транскрипции именно с промотора LTR.

Подводя итог описанию роли белка Ku в регуляции транскрипции ВИЧ-1, необходимо отметить, что полученные к настоящему времени данные достаточно противоречивы. Возможно, это связано с использованием разных клеточных линий и разных вирусных систем. Так, большинство данных о негативной регуляции получены на клетках грызунов, которые, очевидно, не могут служить полноценной моделью процессов, происходящих в клетках человека, инфицированных ВИЧ-1. Тем не менее данные, полученные на клетках человека, позволяют сделать несколько достоверных выводов.

Первое общее наблюдение – зависимость Ku-опосредованной регуляции транскрипции от вирусного LTR. Механизм этой регуляции пока не понятен,

но нельзя исключить возможности прямого связывания гетеродимера и LTR, хотя предполагаемый в работе [6] Ku-связывающий сайт в составе LTR, по видимому, не является ключевым элементом в Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1, в отличие от MMTV и HTLV-1.

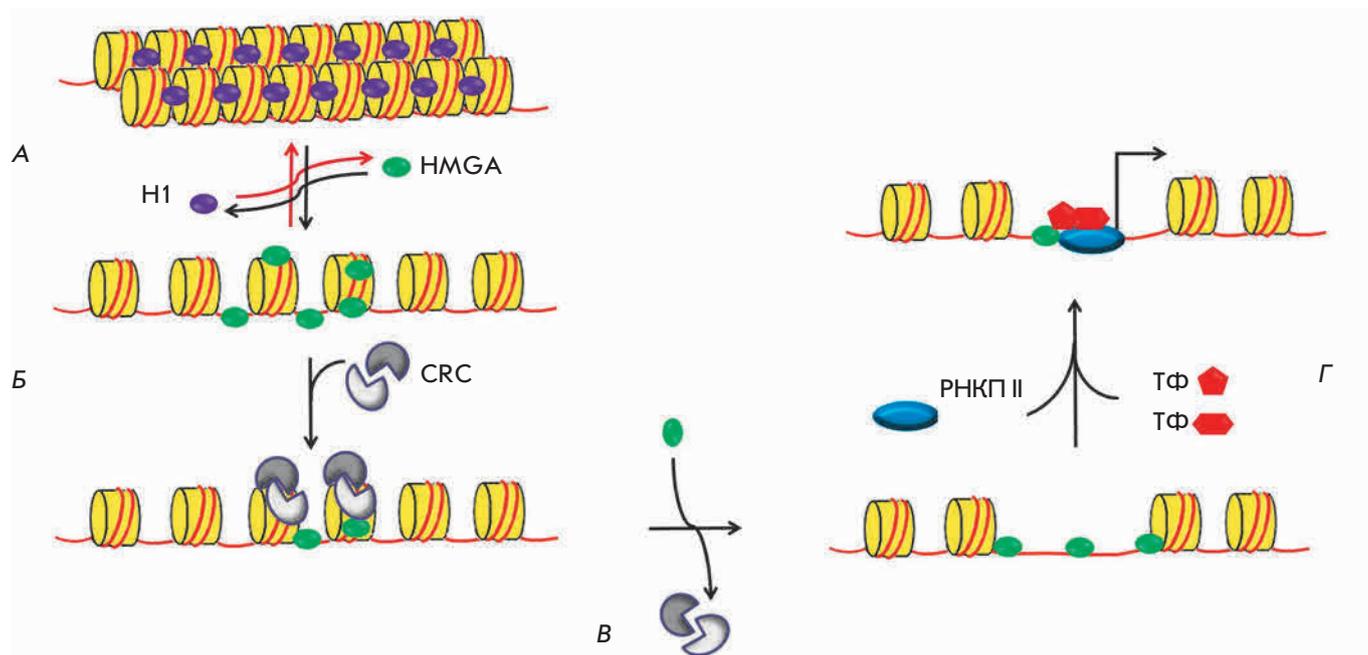
Во-вторых, для Ku-опосредованной регуляции транскрипции ВИЧ-1 и лентивирусных векторов на его основе важен именно интегрированный провирус. Хотя транскрипция ВИЧ-1 может осуществляться с кольцевых ДНК, очевидно, что Ku не участвует в ее регуляции. Возможно, это объясняется тем, что привлечение гетеродимера к провирусу происходит в процессе интеграции или непосредственно после нее.

Отметим еще раз, что остается много вопросов о механизме участия Ku в регуляции транскрипции ВИЧ-1. Так или иначе, даже если считать включение гетеродимера Ku70/Ku80 или целой DNA-РК в состав транскрипционного комплекса установленным фактом, способ их влияния на экспрессию генов ВИЧ-1 не выяснен, и выяснение их роли в транскрипции ВИЧ-1 остается важным и актуальным.

### РОЛЬ НМГА1 В ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1

Еще один клеточный белок, роль которого в жизненном цикле ВИЧ-1 мало изучена, – это НМГА1 (high mobility group protein A1, прежнее название – HMG I(Y)), ДНК-связывающий белок хроматина негистоновой природы. НМГА1 имеет три ДНК-связывающих мотива, которые предпочтительно связываются с малой бороздкой ДНК в АТ-богатых участках (A/T hook) [61]. Вместе с тем, НМГА1 скорее распознает пространственную структуру ДНК, нежели нуклеотидную последовательность: он предпочтительнее взаимодействует с изогнутыми и суперскрученными ДНК, с ДНК, структура которых отличается от классической В-формы. Этот белок в свободном состоянии имеет неупорядоченную пространственную структуру. При взаимодействии с ДНК он претерпевает конформационные изменения, способствуя АТР-независимому расплетанию, суперскручиванию и изгибанию ДНК [62, 63]. Эта способность изменять структуру хроматина определяет широкий спектр функций, выполняемых НМГА1 в ядре клетки.

Вообще, все белки, входящие в семейство группы с высокой подвижностью («high mobility group»), обладают способностью хорошо связывать как ДНК, так и белки, что позволяет им участвовать в большом количестве процессов [64]. Изменение структуры хроматина, вызываемое связыванием НМГА, стимулирует или подавляет такие ДНК-зависимые процессы, как транскрипция, репликация, репара-



**Рис. 6.** Возможная модель опосредованной HMG A1-активации транскрипции. Предположительный механизм регуляции транскрипции HMG A1: HMG A1 способствует реорганизации хроматина, открывая сайты ДНК для посадки факторов, запускающих транскрипцию. А – HMG A1 конкурирует с гистонем H1, вытесняя его с ДНК. Б – декомпактизация хроматина с помощью хроматинремоделлирующих комплексов (CRC – chromatin remodeling complexes). Связывание CRC с хроматином повышается при его взаимодействии с HMG A1. В – высвобождение ДНК для связывания с транскрипционными факторами. Г – инициация транскрипции: HMG A1 может взаимодействовать с транскрипционными факторами (ТФ), привлекая их к промотору. По данным [62]

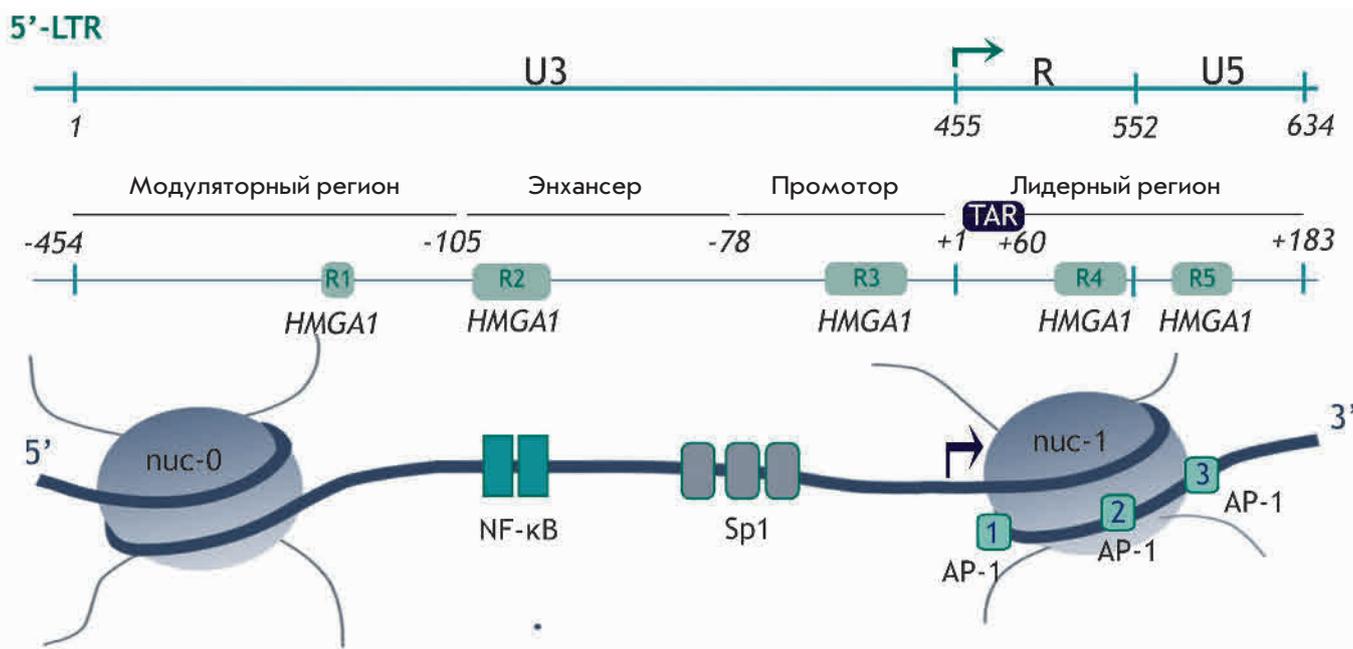
ция. HMG A1 считается архитектурным фактором транскрипции, что подчеркивает его значение в организации мультибелковых комплексов, собирающихся на промоторе [62–64]. Способность HMG A1 взаимодействовать с коровыми гистонами и вытеснять с ДНК линкерный гистон H1 приводит к реорганизации хроматина и открытию сайтов посадки транскрипционных факторов (рис. 6). HMG A1 играет важную роль в регуляции сборки или разборки энхансомы, тем самым влияя на транскрипцию. Неоднократно показано прямое взаимодействие HMG A1 с другими хроматинремоделлирующими белками и факторами транскрипции (Sp1, TFIID, NF- $\kappa$ B, ATF-2, SRF, Oct2, c-Rel). [62, 63]. Способность HMG A1 изгибать ДНК при связывании, возможно, облегчает пространственное сближение энхансерного и промоторного участков генов.

Участие HMG A1 в жизненном цикле ВИЧ-1 показано неоднократно. Этот белок обнаружен в составе прединтеграционного комплекса [65]. Установлено, что HMG A1 стимулирует интеграцию ДНК ВИЧ-1 в клеточный геном [66, 67]. Предполагается, что HMG A1 связывает и изгибает вирусную ДНК, что приводит к сближению ее концов и способству-

ет их связыванию с интегразой. При этом не наблюдали прямого взаимодействия HMG A1 и интегразы ВИЧ-1. Однако в других работах оспаривается участие HMG A1 в интеграции ретровируса, поскольку отсутствие HMG A1 в инфицированных клетках не влияло на встраивание вирусного генома [68].

К настоящему времени получены некоторые, также неоднозначные, свидетельства в пользу участия HMG A1 в транскрипции ВИЧ-1.

С помощью футпринтинга ДНКазой I в области -187/+230 в составе 5'-LTR ВИЧ-1 обнаружены возможные сайты связывания HMG A1 (R1–R5 на рис. 7) [69]. Изучено также взаимодействие HMG A1 и фактора транскрипции AP-1, которые, как оказалось, имеют общий сайт связывания (R5 на рис. 7). Этот сайт находится на границе репрессирующей нуклеосомы *pac-1*, которая существует на провирусе рядом с местом старта транскрипции в латентной фазе и разрушается при активации транскрипции вирусного генома (рис. 7). Оказалось, что HMG A1 способствует связыванию AP-1, важного индуцируемого активатора транскрипции ВИЧ-1, с вирусной ДНК в ответ на внешние стимулы, активирующие экспрессию вируса. Вероятно, HMG A1 участвует в ре-



**Рис. 7.** Положение предсказанных сайтов связывания HMG A1 на 5'-LTR ВИЧ-1. Указано положение районов 5'-LTR: U3 (нуклеотиды 1–455), R (456–552), U5 (553–634). Отсчет нуклеотидов от начала генома. Показаны основные регуляторные регионы 5'-LTR. +1 – отсчет от старта транскрипции, указанного стрелкой. Показаны сайты связывания HMG A1, определенные в [69]. Снизу показано положение нуклеосом на промоторе ВИЧ-1, отмечены три сайта связывания с транскрипционным фактором AP-1

организации *nuc-1*, конкурируя за этот сайт и тем самым освобождая его для AP-1. Таким образом, предполагается, что HMG A1 может быть положительным регулятором транскрипции ВИЧ-1 [69].

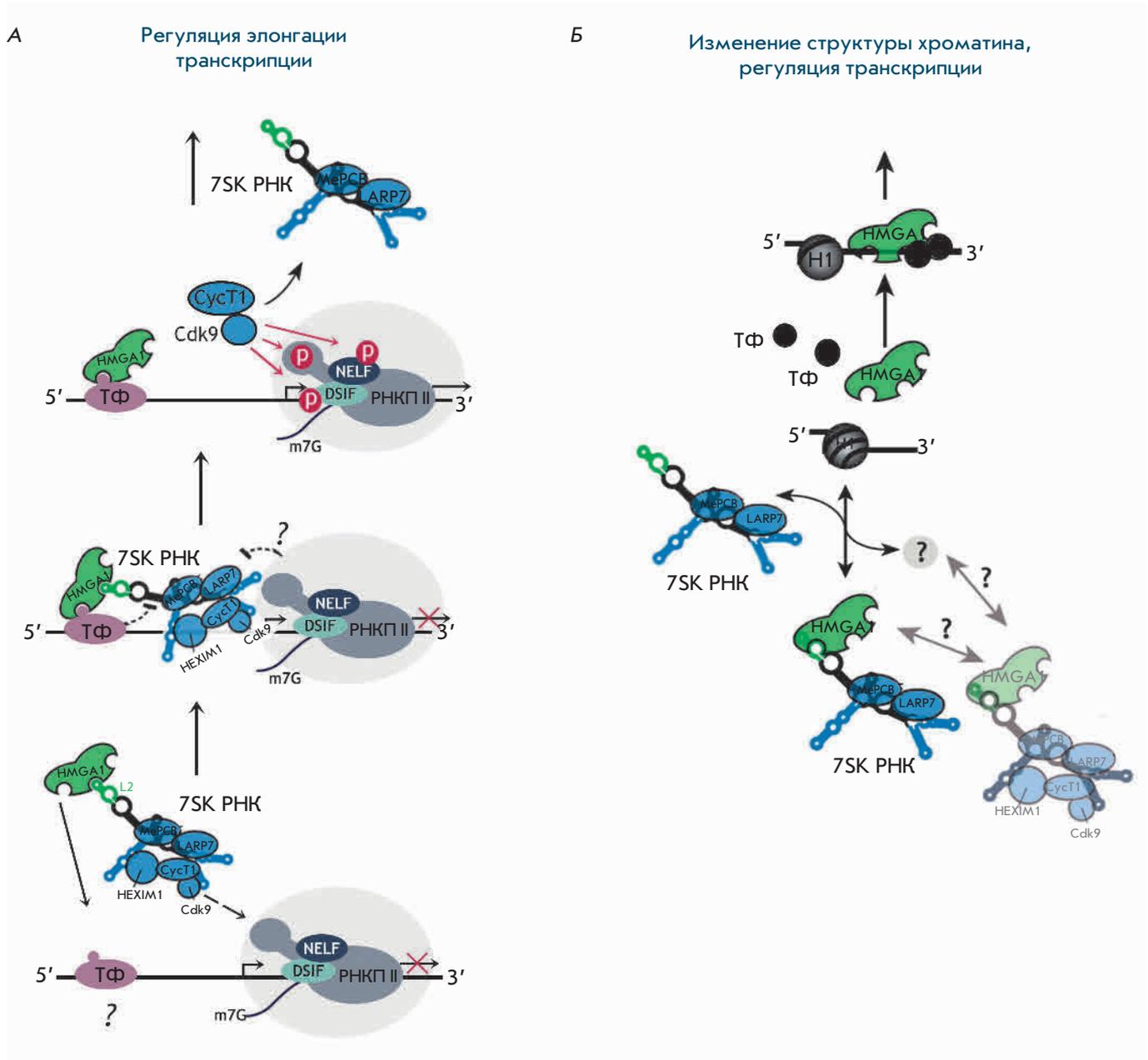
Подтверждена роль HMG A1 как архитектурного фактора транскрипции, участвующего в реорганизации нуклеосомы *nuc-1* [70]. Оказалось, что в ответ на индукцию вирусной транскрипции с помощью PMA (phorbol myristate acetate – активатор NF-κB) HMG A1 способствует связыванию субъединицы ATF-3 фактора AP-1 с сайтом R3 на границе *nuc-1* (рис. 7). Это позволяет привлечь к репрессирующей нуклеосоме АТФ-зависимый хроматинре моделирующий комплекс SWI/SNF, что необходимо для эффективной активации вирусной транскрипции.

Недавно был предложен еще один возможный способ участия HMG A1 в регуляции транскрипции [71]. Оказалось, что HMG A1 связывается с РНК-петлей L2 в 7SK мяРНК. Как отмечалось выше, главная функция 7SK РНК – регуляция количества свободного фактора Р-TEFb, активирующего элонгацию транскрипции [17]. Этот фактор взаимодействует с петлей L1 и белком HEXIM1 в составе 7SK мяРНК. В результате может образоваться сложный комплекс HMG A1 с 7SK мяРНК и Р-TEFb. Роль этого комплекса в регуляции транскрипции может быть двойкой

(рис. 8) [72]. Во-первых, HMG A1 может связываться непосредственно с ДНК или каким-либо транскрипционным фактором на промоторе и привлекать Р-TEFb к приостановленному элонгационному комплексу РНКП II (рис. 8А). Во-вторых, связывание 7SK с HMG A1 регулирует количество свободного HMG A1, способного взаимодействовать с ДНК и выполнять свои функции в разных процессах (рис. 8Б). Предполагается, что реализуемый механизм зависит от конкретного гена.

В случае регуляции транскрипции ВИЧ-1 фактором, взаимодействующим с HMG A1 и привлекаемым за счет этого к элонгационному комплексу, может быть Sp1. Известно, что этот фактор, с одной стороны, участвует в транскрипции ВИЧ-1 [1, 13], а с другой, взаимодействует непосредственно с HMG A1 [62]. Таким образом, при транскрипции с 5'-LTR ВИЧ-1 HMG A1 может участвовать в Р-TEFb-зависимой активации элонгации по схеме, приведенной на рис. 8А [72], и, следовательно, проявлять стимулирующий эффект.

Еще один механизм влияния HMG A1 на транскрипцию ВИЧ-1 был найден при изучении экспрессии репортерного белка с плазмиды, в которой его ген контролировался вирусным 5'-LTR [4]. В этом случае оказалось, что HMG A1 обладает репрессирующим



**Рис. 8.** Механизм регуляции транскрипции комплексом HMG A1–7SK–P-TEFb. **А** – HMG A1 за счет взаимодействия с ДНК или с некоторым транскрипционным фактором может привлекать P-TEFb в комплексе с 7SK мяРНП к приостановленному транскрипционному комплексу. **Б** – количество свободного HMG A1 в ядре регулируется его связыванием с 7SK мяРНП. Диссоциации HMG A1 из комплекса с 7SK мяРНП возможна под действием пока не идентифицированного фактора. По данным [4, 72]

действием. Детальное исследование механизма действия HMG A1 показало, что HMG A1 способен связываться с TAR РНК, структура концевой участка которой похожа на структуру петли L2 в 7SK РНК в составе мяРНП (рис. 9), причем HMG A1 может конкурировать с вирусным белком Tat за связывание с TAR РНК. Это обуславливает отрицательное влияние HMG A1 на транскрипцию ВИЧ-1 как в при-

сутствии Tat, так и в его отсутствие. Изучено влияние сверхэкспрессии и нокдауна гена *HMG A1* и петли L2 из 7SK РНК на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в присутствии и в отсутствие Tat. Оказалось, что HMG A1 снижает и базальную, и активированную Tat транскрипцию с промотора ВИЧ-1, которая частично восстанавливается при сверхэкспрессии петли L2. На основании этого эксперимента предложена

модель репрессии, опосредованной HMGA1 (рис. 10) [4]. Согласно этой модели, HMGA1 мешает связыванию TAR РНК с Tat, а при отсутствии Tat с неким, пока не описанным, клеточным кофактором вирусной транскрипции. Петля L2 в 7SK РНК конкурирует с TAR за HMGA1, разрушая их комплекс и забирая белок с промотора ВИЧ-1. Это способствует активации транскрипции. Однако вопрос о существовании и природе клеточного кофактора, участвующего в этом процессе, остается открытым.

Предложена и другая модель репрессирующего действия HMGA1 на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 [5]. В регуляции транскрипции ВИЧ-1 важное место занимают факторы, связанные с реорганизацией хроматина и среди них такой белок, как СТИР2. Присутствие СТИР2 на промоторе приводит к репрессии транскрипции интегрированного генома ВИЧ-1 и характерно для латентного состояния вируса. СТИР2 осуществляет привлечение гистон-деацетилаз и гистон-метилтрансфераз и участвует таким

образом в конденсации хроматина [73]. Кроме этого, СТИР2 взаимодействует с факторами Sp1 и COUP-TF, репрессируя начальные стадии транскрипции ВИЧ-1 [74], а также участвует в делокализации

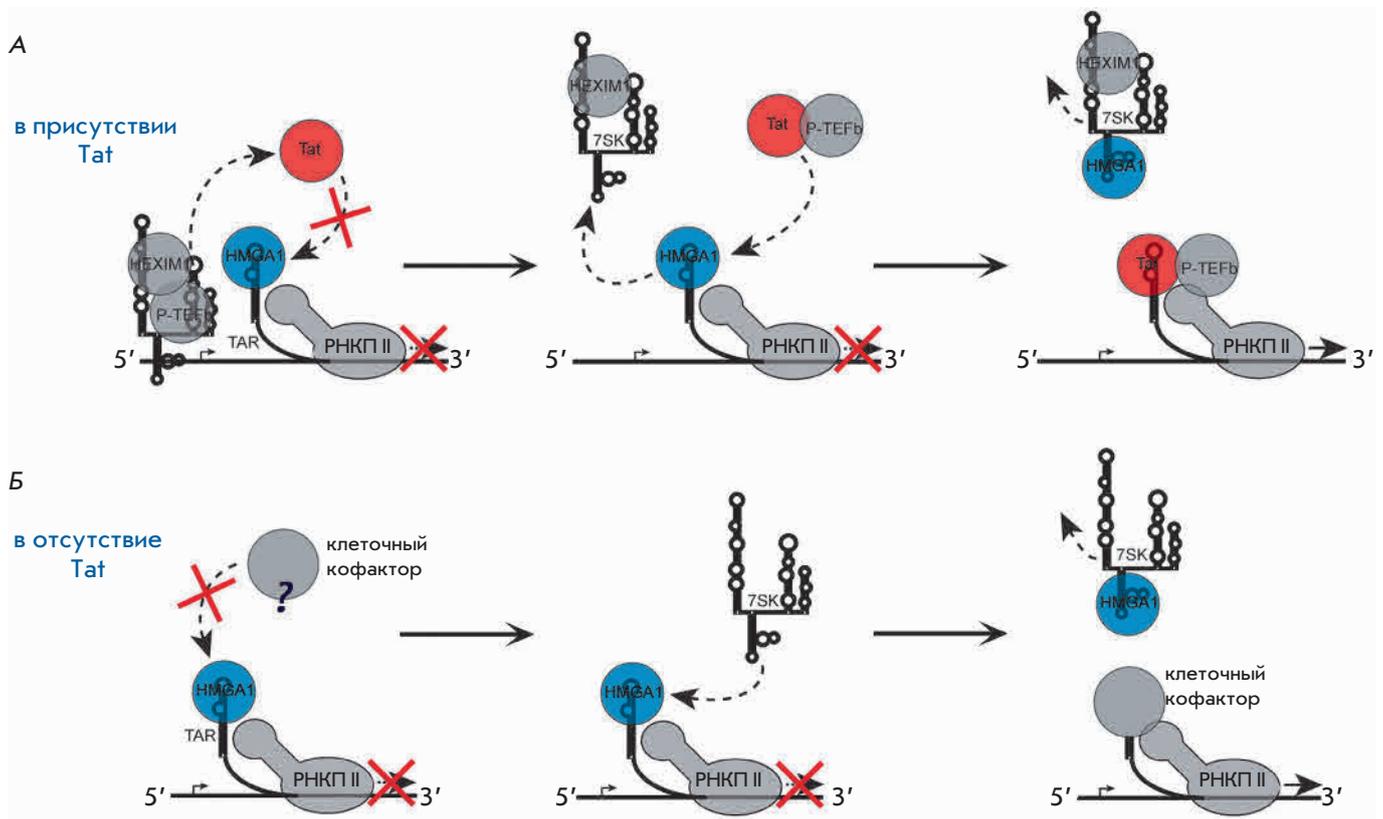
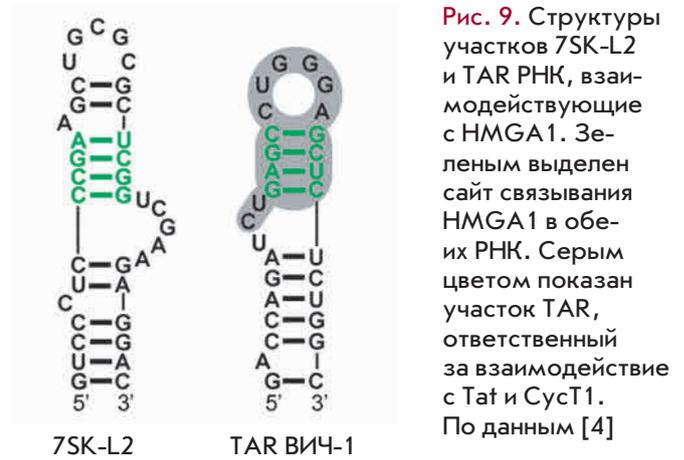
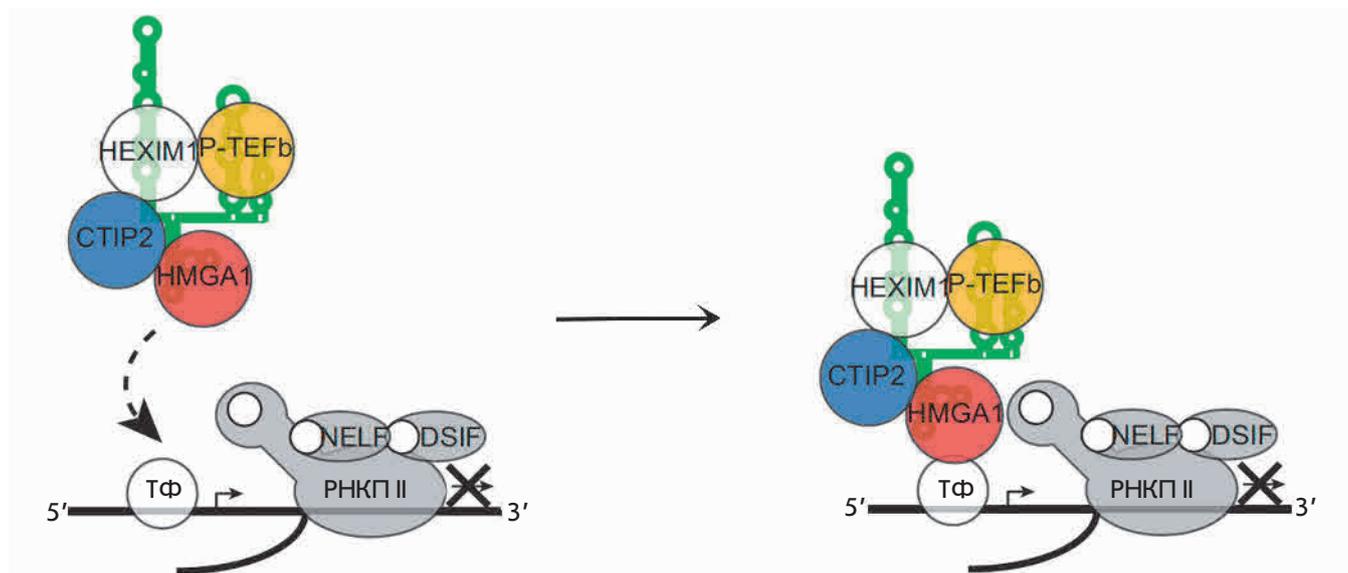


Рис. 10. Модель HMGA1-опосредованной репрессии транскрипции ВИЧ-1. А – конкуренция HMGA1 с Tat за TAR приводит к снижению активности вирусного промотора. Tat высвобождает 7SK из связанного на промоторе комплекса с P-TEFb. 7SK связывается с HMGA1, освобождая TAR для взаимодействия с Tat-P-TEFb. Б – в отсутствие Tat HMGA1 препятствует связыванию с TAR РНК некоторого клеточного кофактора, необходимого для TAR-опосредованной транскрипции ВИЧ-1. 7SK связывается с HMGA1, освобождая TAR для взаимодействия с этим кофактором. По данным [4]



**Рис. 11.** Модель кооперативной регуляции транскрипции HMGA1 и STIP2. STIP2-репрессированный 7SK/P-TEFb-комплекс привлекается к промотору через взаимодействие с HMGA1, связанным с L2-петлей 7SK, с ДНК либо с транскрипционным фактором, находящимся на промоторе. По данным [5]

Tat и связывании его с белком HP1, ассоциированным с гетерохроматином [75]. Недавно показали, что STIP2 взаимодействует с 7SK мРНК, связываясь с петлей L2 и белком HEXIM1. В составе этого комплекса STIP2 участвует в репрессии киназы Cdk9, входящей в состав P-TEFb [76]. Установлено, что HMGA1 может связываться с STIP2 [5]. Более того, транскрипция ряда клеточных генов негативно регулируется обоими белками, при этом часть генов транскрибируется по P-TEFb/7SK-зависимому механизму [5]. Предложена модель совместной регуляции транскрипции этих генов белками HMGA1 и STIP2. Предполагается, что HMGA1 может привлекать к промоторам регулируемых генов сам STIP2 или комплекс STIP2/P-TEFb/7SK мРНК (рис. 11) [5].

Показано, что HMGA1 и STIP2, взаимодействуя с промотором ВИЧ-1, синергически репрессируют базальную транскрипцию [5]. Нокаун гена *HMGA1* приводит к значительному снижению количества STIP2 и P-TEFb/7SK мРНК, привлеченного на вирусный промотор, и, таким образом, восстанавливает уровень транскрипции с него. Таким образом, предполагается, что на 5'-LTR запускается механизм опосредованной HMGA1 отрицательной регуляции транскрипции, подобный приведенному на рис. 11. Тем не менее в случае ВИЧ-1 остается непонятным, какой участок ДНК или фактор, связанный с LTR, участвует в привлечении комплекса HMGA1/STIP2/7SK мРНК. Не ясна и роль связывания TAR

и HMGA1 в опосредованной HMGA1/STIP2 репрессии базальной транскрипции. Не изучено также, влияет ли HMGA1 непосредственно на связывание STIP2 с вирусной ДНК, как в случае с активатором транскрипции AP-1 [69].

Таким образом, HMGA1 может служить как активатором, так и репрессором транскрипции ВИЧ-1. При этом показано его положительное действие на индуцируемую транскрипцию, в то время как отрицательное – на базальную. Возможно, действие внешних индукторов запускает смену белков-партнеров HMGA1 и последующее изменение пути HMGA1-опосредованной регуляции транскрипции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на активное изучение особенностей транскрипции ВИЧ-1, многие моменты остаются не до конца понятными. Хорошо известно, что элонгация транскрипции вирусного генома происходит после связывания TAR РНК с вирусным регуляторным белком Tat, который, взаимодействуя с мультибелковым фактором элонгации транскрипции P-TEFb, привлекает его на вирусный промотор. Входящая в состав P-TEFb циклинзависимая киназа Cdk9 осуществляет необходимое для элонгации фосфорилирование РНКП II. Однако возникает вопрос, каким образом активируется транскрипция «спящего» интегрированного вируса, когда в клетке отсутствует белок Tat? Тем не менее провирус способен транскрибироваться на базальном уровне. Предполагается,

что в таких случаях фосфорилирование РНКП II, необходимое для снятия транскрипционного блока и перехода в стадию элонгации, может активироваться с помощью клеточных факторов. Возможно также, что какие-то клеточные факторы привлекают Р-TEF $\beta$  на промотор.

Регуляция транскрипции ВИЧ-1 – процесс, в котором участвует множество клеточных белков, однако роль не всех из них полностью понятна. К числу таких «непонятых» факторов относятся два клеточных белка – Ku и HMGA1, описанные в настоящем обзоре. Получены данные и о стимулирующем, и о репрессирующем влиянии обоих белков на экспрессию генов ВИЧ-1. Зачастую их роль особенно заметна при базальной транскрипции.

Большая часть исследований, выполненных на клетках человека, показывает, что гетеродимер Ku активирует транскрипцию с промотора ВИЧ-1. В ряде работ описана важность каталитической субъединицы DNA-РК для активации транскрипции. Предложена гипотеза об участии DNA-РК на стадии элонгации транскрипции [10]. Отметим, что способность DNA-РК фосфорилировать РНКП II делает эту киназу привлекательным кандидатом на роль белкового фактора, активирующего элон-

гацию транскрипции вирусных генов в отсутствие Tat.

В процессе регуляции транскрипции ВИЧ-1 архитектурный фактор HMGA1 может воздействовать на состояние хроматина. В этом случае наблюдается положительное действие HMGA1. С другой стороны, показанное *in vitro* взаимодействие HMGA1 и TAR, по-видимому, приводит к подавлению базальной транскрипции генов ВИЧ-1 и важно для поддержания латентности [4]. Еще одним способом HMGA1-опосредованного подавления транскрипции может быть привлечение к промотору репрессирующего транскрипционного фактора, входящего в состав 7SK мРНК, с которым способен связываться HMGA1. Возможно, не существует единого механизма участия HMGA1 в регуляции транскрипции генов ВИЧ-1, а функция этого белка зависит от фазы инфекции и активности других клеточных белков. Так или иначе, выяснение механизмов влияния Ku и HMGA1 на транскрипцию ВИЧ-1 может привести к созданию новых путей воздействия на репликацию этого опасного вируса. ●

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00061).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van Lint C., Bouchat S., Marcello A. // *Retrovirology*. 2013. V. 10. P. 67.
- Ruelas D.S., Greene W.C. // *Cell*. 2013. V. 155. № 3. P. 519–529.
- Zhou M., Halanski M.A., Radonovich M.F., Kashanchi F., Peng J., Price D.H., Brady J.N. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 14. P. 5077–5086.
- Eilebrecht S., Wilhelm E., Benecke B.-J., Bell B., Benecke A.G. // *RNA Biol.* 2013. V. 10. № 3. P. 436–444.
- Eilebrecht S., Le Douce V., Riclet R., Targat B., Hallay H., van Driessche B., Schwartz C., Robette G., van Lint C., Rohr O., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 8. P. 4962–4971.
- Jeanson L., Mouscadet J.F. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 7. P. 4918–4924.
- Masson C., Bury-Moné S., Guiot E., Saez-Cirion A., Schoëvaert-Brossault D., Brachet-Ducos C., Delelis O., Subra F., Jeanson-Leh L., Mouscadet J.F. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 15. P. 7924–7932.
- Waninger S., Kuhen K., Hu X., Chatterton J.E., Wong-Staal F., Tang H. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 23. P. 12829–12837.
- Manic G., Maurin-Marlin A., Laurent F., Vitale I., Thierry S., Delelis O., Dessen P., Vincendeau M., Leib-Mösch C., Hazan U., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. P. 69691.
- Tyagi S., Ochem A., Tyagi M. // *J. Gen. Virol.* 2011. V. 92. № 7. P. 1710–1720.
- Meyerhans A., Breinig T., Vartanian J.-P., Wain-Hobson S. *HIV Sequence Compendium 2003*. Los Alamos National Laboratory: Theoretical Biology and Biophysics Group, 2003. 420 p.
- Sloan R.D., Wainberg M.A. // *Retrovirology*. 2011. V. 8. P. 52.
- Colin L., Verdin E., van Lint C. // *Meth. Mol. Biol.* 2014. V. 1087. P. 85–101.
- Taube R., Peterlin M. // *Viruses*. 2013. V. 5. № 3. P. 902–927.
- Kwak H., Lis J.T. // *Annu. Rev. Genet.* 2013. V. 47. P. 483–508.
- Nguyen V.T., Kiss T., Michels A.A., Bensaude O. // *Nature*. 2001. V. 414. № 6861. P. 322–325.
- Peterlin B.M., Price D.H. // *Mol. Cell.* 2006. V. 23. № 3. P. 297–305.
- Emiliani S., van Lint C., Fischle W., Paras P. Jr., Ott M., Brady J., Verdin E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 13. P. 6377–6381.
- Bieniasz P.D., Grdina T.A., Bogerd H.P., Cullen B.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 14. P. 7791–7796.
- Yedavalli V.S., Benkirane M., Jeang K.T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 8. P. 6404–6410.
- Itzen F., Greifenberg A.K., Bösken C.A., Geyer M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 12. P. 7577–7590.
- Patel M.C., Debrosse M., Smith M., Dey A., Huynh W., Sarai N., Heightman T.D., Tamura T., Ozato K. // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. № 12. P. 2497–2507.
- Jin S., Weaver D.T. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 22. P. 6874–6885.
- Ochem A.E., Skopac D., Costa M., Rabilloud T., Vuillard L., Simoncsits A., Giacca M., Falaschi A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 47. P. 29919–29926.
- Dynan W.S., Yoo S. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. № 7. P. 1551–1559.
- Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. // *Nature*. 2001. V. 412. № 6847. P. 607–614.
- Postow L. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. № 18. P. 2876–2882.
- Hill R., Lee P.W. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 17. P. 3460–3469.

29. Fell V.L., Schild-Poulter C. // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015. V. 763. P. 15–29.
30. Yang S.H., Nussenzweig A., Li L., Kim D., Ouyang H., Burgman P., Li G.C. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 7. P. 3799–3806.
31. Knuth M.W., Gunderson S.I., Thompson N.E., Strasheim L.A., Burgess R.R. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 29. P. 17911–17920.
32. Okumura K., Takagi S., Sakaguchi G., Naito K., Minoura-Tada N., Kobayashi H., Mimori T., Hinuma Y., Igarashi H. // *FEBS Lett.* 1994. V. 356. № 1. P. 94–100.
33. Giffin W., Torrance H., Rodda D.J., Préfontaine G.G., Pope L., Hache R.J. // *Nature.* 1996. V. 380. № 6571. P. 265–268.
34. Giffin W., Kwast-Welfeld J., Rodda D.J., Préfontaine G.G., Traykova-Andonova M., Zhang Y., Weigel N.L., Lefebvre Y.A., Haché R.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 9. P. 5647–5658.
35. Giffin W., Gong W., Schild-Poulter C., Haché R.J. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. № 6. P. 4065–4078.
36. Shi L., Qiu D., Zhao G., Corthesy B., Lees-Miller S., Reeves W.H., Kao P.N. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 7. P. 2302–2310.
37. Schild-Poulter C., Shih A., Yarymowich N.C., Haché R.J. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 21. P. 7197–7205.
38. Jiang D., Zhou Y., Moxley R.A., Jarrett H.W. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 35. P. 9318–9334.
39. Wang H., Fang R., Cho J.Y., Libermann T.A., Oettgen P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 24. P. 25241–25250.
40. Sucharov C.C., Helmke S.M., Langer S.J., Perryman M.B., Bristow M., Leinwand L. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 19. P. 8705–8715.
41. Hill R., Madureira P.A., Waisman D.M., Lee P.W. // *Oncotarget.* 2011. V. 2. № 12. P. 1094–1108.
42. Mayeur G.L., Kung W.J., Martinez A., Izumiya C., Chen D.J., Kung H.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 11. P. 10827–10833.
43. Sartorius C.A., Takimoto G.S., Richer J.K., Tung L., Horwitz K.B. // *J. Mol. Endocrinol.* 2000. V. 24. № 2. P. 165–182.
44. Medunjanin S., Weinert S., Schmeisser A., Mayer D., Braun-Dullaeus R.C. // *Mol. Biol. Cell.* 2010. V. 21. № 9. P. 1620–1628.
45. Lim J.W., Kim H., Kim K.H. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 1. P. 231–237.
46. Dvir A., Stein L.Y., Calore B.L., Dynan W.S. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 14. P. 10440–10447.
47. Maldonado E., Shiekhattar R., Sheldon M., Cho H., Drapkin R., Rickert P., Lees E., Anderson C.W., Linn S., Reinberg D. // *Nature.* 1996. V. 381. № 6577. P. 86–89.
48. Mo X., Dynan W.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 22. P. 8088–8099.
49. Peterson S.R., Dvir A., Anderson C.W., Dynan W.S. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 3. P. 426–438.
50. Ju B.G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. // *Science.* 2006. V. 312. № 5781. P. 1798–1802.
51. Studamire B., Goff S.P. // *Retrovirology.* 2008. V. 5. P. 48.
52. Zheng Y., Ao Z., Wang B., Jayappa K.D., Yao X. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 20. P. 17722–17735.
53. Santos S., Obukhov Y., Nekhai S., Bukrinsky M., Iordanskiy S. // *Retrovirology.* 2012. V. 9. P. 65.
54. Skalka A.M., Katz R.A. // *Cell Death Differ.* 2005. V. 12. P. 971–978.
55. Daniel R., Greger J.G., Katz R.A., Taganov K.D., Wu X., Kappes J.C., Skalka A.M. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 16. P. 8573–8581.
56. Daniel R., Katz R.A., Merkel G., Hittle J.C., Yen T.J., Skalka A.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. № 4. P. 1164–1172.
57. Jeanson L., Subra F., Vaganay S., Hervy M., Marangoni E., Bourhis J., Mouscadet J.F. // *Virology.* 2002. V. 300. № 1. P. 100–108.
58. Li L., Olvera J.M., Yoder K.E., Mitchell R.S., Butler S.L., Lieber M., Martin S.L., Bushman F.D. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 12. P. 3272–3281.
59. Kilzer J.M., Stracker T., Beitzel B., Meek K., Weitzman M., Bushman F.D. // *Virology.* 2003. V. 314. № 1. P. 460–467.
60. Hoover T., Mikovits J., Court D., Liu Y.L., Kung H. F., Raziuddin // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. № 10. P. 1895–1900.
61. Reeves R., Nissen M.S. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 15. P. 8573–8582.
62. Ozturk N., Singh I., Mehta A., Braun T., Barreto G. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2014. V. 2. P. 5.
63. Reeves R. // *Meth. Enzymol.* 2004. V. 375. P. 297–322.
64. Cleyne I., van de Ven W.J. // *Int. J. Oncol.* 2008. V. 32. № 2. P. 289–305.
65. Farnet C.M., Bushman F.D. // *Cell.* 1997. V. 88. № 4. P. 483–492.
66. Hindmarsh P., Ridky T., Reeves R., Andrade M., Skalka A.M., Leis J. // *J. Virol.* 1999. V. 73. № 4. P. 2994–3003.
67. Li L., Yoder K., Hansen M.S., Olvera J., Miller M.D., Bushman F.D. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 23. P. 10965–10974.
68. Beitzel B., Bushman F. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 17. P. 5025–5032.
69. Henderson A., Bunce M., Siddon N., Reeves R., Tremethick D.J. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 22. P. 10523–10534.
70. Henderson A., Holloway A., Reeves R., Tremethick D.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 1. P. 389–397.
71. Eilebrecht S., Brysbaert G., Wegert T., Urlaub H., Benecke B.-J., Benecke A. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 6. P. 2057–2072.
72. Eilebrecht S., Benecke B.J., Benecke A. // *RNA Biol.* 2011. V. 8. № 6. P. 1084–1093.
73. Marban C., Suzanne S., Dequiedt F., de Walque S., Redel L., van Lint C., Aunis D., Rohr O. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 2. P. 412–423.
74. Marban C., Redel L., Suzanne S., van Lint C., Lecestre D., Chasserot-Golaz S., Leid M., Aunis D., Schaeffer E., Rohr O. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 7. P. 2318–2331.
75. Rohr O., Lecestre D., Chasserot-Golaz S., Marban C., Avram D., Aunis D., Leid M., Schaeffer E. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 9. P. 5415–5427.
76. Cherrier T., Le Douce V., Eilebrecht S., Riclet R., Marban C., Dequiedt F., Goumon Y., Paillart J.C., Mericskay M., Parlakian A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 31. P. 12655–12660.

УДК 602.6:59; 602.6:612

# Фаговые пептидные библиотеки как источник адресующих лигандов

А. А. Немудрая, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина\*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск,  
просп. Академика Лаврентьева, 8

\*E-mail: kuligina@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.03.2015

Принята к печати 10.09.2015

**РЕФЕРАТ** Одно из ключевых направлений развития современной фармакологии – создание лекарственных средств, воздействующих непосредственно на очаг поражения и оказывающих минимальный токсический эффект на здоровые ткани и органы. Особенно остро эта проблема стоит в случае онкологических заболеваний. Короткие ткане- и органоспецифические пептиды, способные доставлять лекарственные средства к пораженному органу или ткани, считаются перспективными адресными агентами, которые могут использоваться как в диагностике, так и в терапии заболеваний, в том числе онкологических. В обзоре подробно рассмотрена технология фагового дисплея как метода получения специфических адресных пептидных агентов, приведены примеры их применения в диагностической и клинической практике.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** адресные пептиды, доставка лекарственных средств, фаговый дисплей, фаговые пептидные библиотеки.

## ВВЕДЕНИЕ

Доставка лекарственных средств непосредственно к очагу поражения – одна из основных задач современной фармакологии. Особенно остро эта проблема стоит для онкологических заболеваний. Как правило, противоопухолевые препараты обладают значительной токсичностью, поражая наряду с малигнизированными здоровые клетки и ткани. Поэтому создание принципиально новых противоопухолевых средств, эффективность которых обеспечивается избирательным воздействием на опухоль, рассматривается как одно из ключевых направлений противоопухолевой терапии. Появление таких направленных на опухоль препаратов позволит снизить эффективную терапевтическую дозу и минимизировать побочные эффекты.

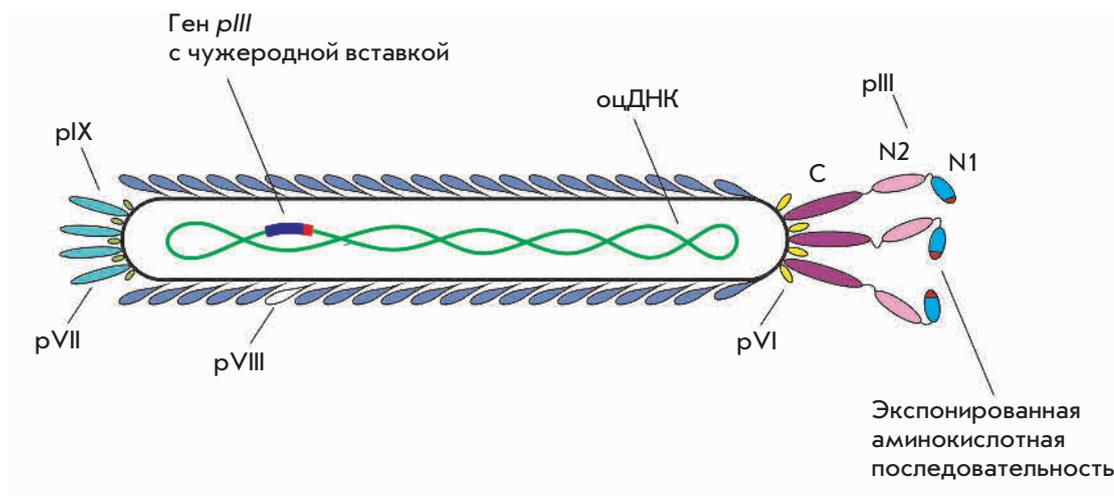
Известно, что раковые клетки обладают многими количественными и/или качественными признаками, отличающими их от нормальных клеток. Так, экспрессия рецепторов факторов роста, таких, как рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторы трансферрина и фолиевой кислоты, зачастую повышена на опухолевых клетках, что обеспечивает их неконтролируемую пролиферацию и способствует процессам метастазирования [1]. Известно также, что рост опухоли сопровождается активными процессами ангиогенеза, которые во взрослом организме активируются в основном при регенерации поврежденных тканей. Процессы ангиогенеза могут

активироваться, например, при повышении уровня экспрессии факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF) [2]. Наконец, существуют физические отличия опухолевой ткани от нормальной: изменение температуры, низкая концентрация кислорода (гипоксия) и снижение pH [3].

Совокупность уникальных свойств раковых клеток позволяет находить специфические лиганды, взаимодействующие непосредственно с опухолью, и проводить направленную (таргетную) терапию злокачественных новообразований.

Технология фагового дисплея – один из перспективных подходов к поиску ткане- и/или органоспецифических молекул. Комбинаторные фаговые пептидные библиотеки позволяют получать высокоспецифические пептиды, в том числе к различным типам опухолей. Поиск опухолеспецифических пептидов с помощью комбинаторных фаговых пептидных библиотек можно осуществлять в системах *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время такие опухолеспецифические пептиды рассматриваются в качестве таргетных средств доставки терапевтических генов, цитокинов, агентов для визуализации, проапоптотических пептидов и цитотоксических препаратов.

В обзоре подробно рассмотрена технология фагового дисплея как метода получения адресующего агента, способного обеспечить специфичность взаимодействия лекарственного средства и органа или ткани-мишени. Приведены примеры использо-



**Рис. 1.** Строение бактериофага с экспонированной аминокислотной последовательностью в составе поверхностного белка pIII (отмечено красным цветом). N1, N2 и C – домены поверхностного белка pIII

вания органо- и тканеспецифических пептидов в биомедицине.

### ТЕХНОЛОГИЯ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Технология фагового дисплея, впервые предложенная в 1985 г. G.P. Smith, сыграла важную роль в разработке принципиально новых молекулярно-биологических подходов и открыла новые возможности для развития фармацевтической индустрии. Концепция фагового дисплея заключается в клонировании последовательности чужеродной ДНК в специфический сайт гена поверхностного белка бактериофага так, чтобы эта последовательность находилась в одной рамке считывания с белком. В результате на поверхности бактериофага образуется (представляется) химерный белок, в состав которого включена чужеродная аминокислотная последовательность (рис. 1). При этом физиологические свойства и жизнеспособность вирусной частицы сохраняются [4, 5].

Технология фагового дисплея разработана для различных бактериофагов, например λ, T4, T7 [6–8]. Наиболее широкое применение при создании фагового дисплея получили нитчатые бактериофаги [9], вирионы которых похожи на длинную тонкую нить. Нитчатые фаги имеют небольшие размеры и просто устроенный геном [10]. Наиболее изученные нитчатые фаги – M13, f1 и fd – входят в род *Inovirus* семейства *Inoviridae* и объединяются в группу Ff, поскольку инфицируют *Escherichia coli*, несущие F-пили [11]. Штаммы фагов Ff содержат кольцевую одноцепочечную ДНК, идентичность которой у разных штаммов этой группы составляет 98.5% [10]. Геном Ff-фагов представлен 11 генами, продукты, которые можно сгруппировать по их функциональному назначению: белки капсида – pIII, pVI, pVII,

pVIII, pIX; белки, участвующие в репликации ДНК, – pII, pV, pX; и белки, отвечающие за сборку фаговой частицы, – pI, pIV, pXI (рис. 1) [12].

Как правило, нитчатые бактериофаги инфицируют грамотрицательные бактерии (*Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus* и *Neisseria*). Бактериальная клетка, инфицированная фагом, высвобождает новые вирусные частицы, но сама при этом не лизируется.

В зависимости от того, в каком гене поверхностного белка клонирована чужеродная ДНК, различают несколько типов фагового дисплея (таблица).

Для представления чужеродной аминокислотной последовательности в технологии фагового дисплея

#### Типы фагового дисплея в зависимости от используемого поверхностного белка

Тип фагового дисплея	Используемый поверхностный белок (все ли копии белка представляют чужеродную последовательность)	Число и локализация копий гена поверхностного белка
3	pIII (все)	1 в геноме бактериофага
8	pVIII (все)	1 в геноме бактериофага
33	pIII (частично)	2 в геноме бактериофага
88	pVIII (частично)	2 в геноме бактериофага
3+3	pIII (частично)	2 в геноме бактериофага и фагмидном векторе
8+8	pVIII (частично)	2 в геноме бактериофага и фагмидном векторе

наиболее часто используют белки рIII и рVIII (406 и 50 аминокислотных остатков соответственно), которые также называют минорными и мажорными. Оба белка имеют N-концевые сигнальные последовательности, которые отщепляются сигнальной пептидазой в процессе созревания белка после переноса к внутренней части бактериальной мембраны. Зрелые белки встраиваются в оболочку бактериофага в ходе ее сборки. Таким образом, чтобы чужеродный пептид был представлен на поверхности фаговой частицы, кодирующая его нуклеотидная последовательность должна быть клонирована между последовательностью поверхностного белка и сигнальной последовательностью в единой рамке трансляции [13].

Бактериофаг содержит от трех до пяти копий белка рIII. Вместе с рVI они образуют дистальную крышку вириона и необходимы для его стабилизации, а также для терминации сборки фаговой частицы при выходе из бактериальной клетки. Кроме того, рIII играет важную роль при инфицировании, прикрепляясь к бактериальной клетке через F-пили [14]. рIII состоит из трех доменов: N1, N2 и С, разделенных глициновыми спейсерами (рис. 1). Домен С отвечает за сборку вириона, а N1 и N2 – за инфицирование бактериальной клетки [15]. Если встроить короткую нуклеотидную последовательность в ген рIII, то чужеродную вставку будет нести каждая молекула белка рIII. Фаговый дисплей такого вида называется дисплеем типа 3 (таблица).

Одна фаговая частица содержит около 2700 копий белка рVIII, который образует оболочку бактериофага и имеет спиралевидную структуру. На С-конце белка находятся четыре положительно заряженных остатка лизина, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами вирусной оцДНК внутри фага. N-Конец расположен на внешней стороне вирусной частицы [16, 17]. Максимальная длина чужеродной вставки, которая не приводит к значительным нарушениям сборки фаговой частицы и будет экспонирована в каждом белке рVIII, составляет 6–7 аминокислотных остатков (фаговый дисплей типа 8) [18, 19].

При экспозиции длинных чужеродных аминокислотных последовательностей происходит утрата функции химерного белка, что необходимо восполнить белком рIII или рVIII дикого типа. Существуют системы, в которых фаговый геном содержит ген рIII (рVIII) двух типов: рекомбинантный и дикий. В результате только часть белков рIII (рVIII) будет нести чужеродную последовательность, тогда как другая часть сохранит природные функции (тип 33 (88) фагового дисплея) [20]. Восполнение утраченной функции белка может происходить в системах с использованием фагмидных векторов и фагов-помощников

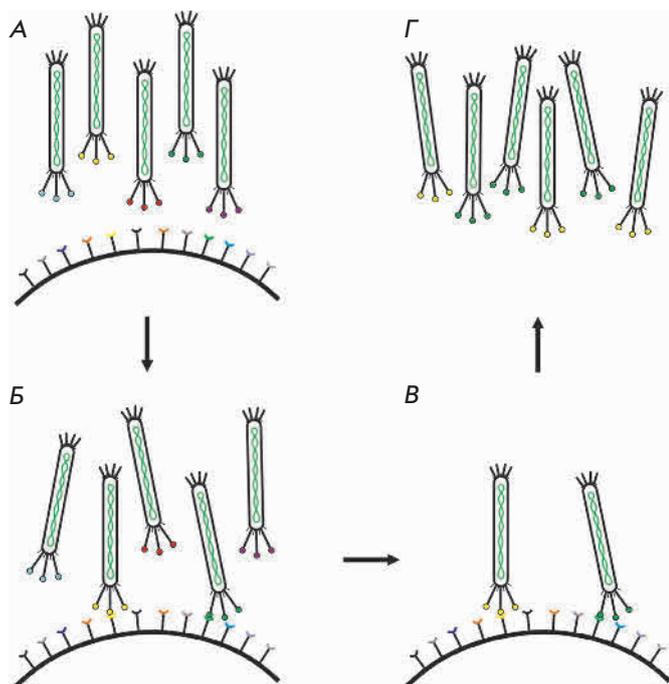
[21, 22]. Фагмидный вектор в таких случаях содержит ориджины репликации плазмиды и фага, последовательность, кодирующую ген устойчивости к антибиотикам, и последовательность, кодирующую химерный белок. Фаг-помощник кодирует белок дикого типа, он необходим для правильной сборки вирусных частиц. При инфицировании ген дикого типа попадает в клетку *E. coli* вместе с фагом-помощником, а рекомбинантный ген находится в плазмиде. В результате зрелые частицы высвобождаемого бактериофага будут устроены по мозаичному типу, т.е. будут содержать белки дикого и рекомбинантного типа (тип 3+3 или 8+8 фагового дисплея) [20].

Первые работы с использованием технологии фагового дисплея были направлены на получение пептидов и белков, способных специфически связываться с антителами. Smith G.P. в своей пилотной работе получил фаговый клон (fECO1), в белок рIII которого был встроены фрагмент рестриктазы EcoRI. Этот клон эффективно нейтрализовался антителами против рестриктазы [4]. В продолжение и развитие этих работ опубликовано множество других, в которых фаговые частицы с экспонированным антигеном служили иммуногенами, способными вызывать ответную реакцию иммунной системы [23–25].

Во второй части своей работы Smith исследовал возможность обогащения смешанной популяции бактериофагов специфическими фагами fECO1 путем аффинного связывания с антителами к EcoRI. К абсорбированным антителам против EcoRI добавляли смесь фагов fECO1 и значительный избыток фага M13mp8 дикого типа. Не связавшиеся фаги отмывали средой, а абсорбированные элюировали кислым буфером, нейтрализовали и титровали. В результате трех последовательных экспериментов получили популяцию, обогащенную фагом fECO1 в 1500–7200 раз по сравнению с фагом дикого типа [4]. На этом этапе возникла идея использовать антитела для отбора специфических клонов из популяции бактериофагов (комбинаторной фаговой библиотеки), где каждая отдельная фаговая частица экспонирует на своей поверхности случайную аминокислотную последовательность. С 1988 г. процедуру аффинного обогащения популяции фагов специфическим бактериофагом стали называть «биоэннингом» [26].

Типичный раунд биоэннинга включает в себя следующие стадии: 1) инкубация комбинаторной фаговой библиотеки с мишенью (белки, культура клеток, опухолевая ткань и т.д.); 2) отмывка не связавшихся фагов; 3) элюция связавшихся фагов; 4) амплификация элюированного фага для последующих раундов (рис. 2).

После нескольких раундов биоэннинга степень обогащения популяции бактериофагом определяют



**Рис. 2.** Схема типичного раунда биопаннинга фаговой библиотеки. **А, Б** – инкубация комбинаторной фаговой библиотеки с мишенью; **В** – отмывка не связавшихся фагов; **Г** – элюция связавшихся фагов и их амплификация для следующих раундов

титрованием и/или иммуноферментными методами. Затем выделяют индивидуальные фаговые клоны и определяют последовательность чужеродной вставки. Важно отметить, что простая физическая связь между экспонированным пептидом и клонированной в геном фага последовательностью позволяет легко анализировать первичную структуру вставки. Благодаря небольшим размерам нитчатых бактериофагов (диаметр 5 нм, длина 1 мкм) концентрация фаговых частиц может достигать  $10^{14}$  частиц/мл, что позволяет проводить скрининг огромного количества вариантов. Представительность пептидной фаговой библиотеки достигает  $10^9$  различных вариантов вставки [27].

Сегодня комбинаторные фаговые библиотеки получили широкое распространение в качестве инструмента, позволяющего решать различные задачи молекулярной биологии, биохимии и биомедицины. Библиотеки могут быть выполнены на основе случайных комбинаций олигопептидов, антител, ферментов, а также фрагментов геномной ДНК, кДНК, открытых рамок считывания или других функциональных районов генома [28–30]. Скрининг библиотек позволяет отбирать молекулы со специфическими свойствами,

изучать белок-белковые взаимодействия, искать субстраты различных ферментов, исследовать маркеры определенных тканей, органов и биохимических процессов, проводить поиск эпитопов антигенов и паратопоов антител и, наконец, получать высоко-специфические молекулы с адресными свойствами [31, 32].

### ОТБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ИЗ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК

Конструирование пептидной библиотеки – один из ключевых моментов успешного скрининга, поскольку вероятность отбора лиганда, который специфически свяжется с определенной мишенью, во многом зависит от разнообразия библиотеки и длины вставки. Одна из наиболее распространенных стратегий конструирования комбинаторной библиотеки пептидов опирается на правила триплетности и вырожденности генетического кода. Эта стратегия заключается в генерировании различных комбинаций на основе кодона  $(NNK)_n$ , где N – эквимолярное соотношение всех четырех нуклеотидов, а K – смесь только гуанина и тимина (1 : 1). Благодаря использованию кодона  $(NNK)_n$  вместо  $(NNN)_n$  число возможных стоп-кодонов сокращается с трех (TAA, TGA, TAG) до одного (TAG), а также выравнивается вероятность кодирования разных аминокислот. Таким образом, 32 возможных варианта кодона  $(NNK)_n$  кодируют 20 канонических аминокислот и один стоп-кодон [13]. Число возможных вариантов аминокислотной последовательности длиной n будет равно  $20^n$ . Однако на практике на представительность библиотеки влияют и другие факторы, такие, как наличие стоп-кодона в последовательности пептида и эффективность трансформации клеток *E. coli* фаговыми конструкциями. Обычно представительность коммерческой фаговой пептидной библиотеки составляет около  $10^9$  фаговых частиц [33]. При этом пептидная вставка может быть как линейной, так и кольцевой за счет образования дисульфидных мостиков между остатками цистеина, фланкирующими вставку.

Как уже сказано, чужеродная вставка может экспонироваться либо белком рIII, либо рVIII. Библиотеки на основе рIII, который представлен всего тремя-пятью копиями на одном из концов вирусной частицы, используют для получения высокоспецифичных лигандов, обладающих высоким сродством к мишени. С помощью таких библиотек получают лиганды с константами диссоциации в пределах 1–10 мкМ [34]. Наиболее часто столь специфические пептиды используют для доставки различных веществ к мишени или визуализации специфических структур и биохимических процессов.

Мажорный белок рVIII, покрывающий капсид, обеспечивает мультивалентное связывание и высокую avidность, что отрицательно отражается на аффинности взаимодействия пептида с мишенью. С помощью библиотек на основе белка рVIII отбирают лиганды с более низкой индивидуальной аффинностью, константы диссоциации таких лигандов находятся в пределах 10–100 мкМ [34]. Однако такие библиотеки также находят широкое применение, поскольку отобранные фаговые частицы обладают высоким сродством к мишени, стабильностью, их можно легко наработать в большом количестве. Например, Lang Q. и соавт. использовали иммуноферментный анализ для детекции простатспецифического антигена (PSA) с помощью отобранного из библиотеки рVIII фагового клона [35]. Показана возможность таргетной доставки миРНК GAPDH в раковые клетки с использованием способности фаговых белков к самосборке в присутствии какой-либо нуклеиновой кислоты [36]. Они использовали фаговую пептидную библиотеку на основе мажорного белка рVIII для отбора клонов, специфических к клеткам аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Рекомбинантные белки рVIII этого клона нарабатывали простой амплификацией фагового клона, отделяли от фаговой частицы и инкубировали с миРНК GAPDH с образованием так называемых нанофагов. Полученные частицы (нанофаги) защищали миРНК GAPDH от деградации нуклеазами плазмы крови, специфически доставляли их к клеткам MCF-7, обеспечивали их интернализацию внутрь клетки и при этом не влияли на функциональность миРНК GAPDH.

Скрининг фаговых пептидных библиотек можно проводить как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. В системе *in vitro* скрининг проводят на самых различных объектах: инактивированных вирусах и бактериях, очищенных фракциях белков, ферментов, рецепторов, функциональных доменов и на культурах клеток [37, 38]. К скринингу *in vitro* также относят отбор на неорганических молекулах (например, металлы) и на синтетических материалах [39].

Наиболее простой и прямой метод отбора специфических пептидов *in vitro* – селекция на очищенной субстанции белка-мишени. Например, с помощью скрининга фаговой пептидной библиотеки, экспонирующей семизвенный пептид, с фактором роста фибробластов 8 (FGF8b) был получен пептид HSQAAVP (P12), специфически связывающийся с рецептором этого фактора. FGF8b является основной изоформой, которая продуцируется клетками рака предстательной железы. Отобранный пептид P12 ингибирует индуцируемую FGF8b пролиферацию клеток, приводит к остановке клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> путем супрессии циклина D1 и PCNA и блокирует

активацию каскадов Erk1/2 и Akt как в клетках рака предстательной железы, так и в клетках эндотелия сосудов. Таким образом, P12, действующий как антагонист FGF8b, может быть потенциальным терапевтическим средством при раке предстательной железы [40].

Недостаток или скорее ограничение такого способа отбора состоит в том, что пептиды, полученные после скрининга на очищенной субстанции белков, могут не обладать таргетностью к мишени *in vivo*. Одной из причин этого могут быть специфические посттрансляционные модификации белков, происходящие при различных процессах, в том числе при злокачественном перерождении клетки. Кроме того, получение растворимой субстанции очищенного белка с сохранением его природной структуры и функции не всегда представляет тривиальную задачу [41].

Скрининг *in vitro* на культурах клеток позволяет успешно отбирать пептиды к различным поверхностным структурам клетки, а также пептиды, способные интернализироваться внутрь клеток как рецептор-опосредованным, так и нерепторным путем, так называемые CPP-пептиды – пептиды с высокой проникающей способностью (от англ. cell penetrating peptides). К преимуществам селекции на культурах клеток относится возможность получения пептидов, специфичных к определенному типу клеток, без знания конкретной мишени, с которой эти пептиды свяжутся.

На основе уже полученных многочисленных данных конструируют фаговые пептидные библиотеки с дополнительными свойствами. Так, например, выделяют новый класс фаговых пептидных библиотек (iPhage libraries), в которых экспонированный пептид способен интернализировать фаговую частицу внутрь клетки и обеспечивать специфическое связывание с клеточными органеллами и функциональными доменами внутриклеточных белков. Пептиды, отобранные из такой библиотеки, позволяют изучать внутриклеточные сигнальные и метаболические пути [42].

Менее распространенным объектом для скрининга фаговой пептидной библиотеки являются различные биологические жидкости. Так, во внеклеточном матриксе опухоли обнаруживается большое количество фибрина, что обусловлено постоянным проникновением фибриногена в строму опухоли и его расщеплением. Pilch J. и соавт. провели биопэннинг со свернувшейся плазмой крови и отобрали два циклических декапептида (CLT1 и CLT2), способных специфически связываться с фибрин-фибронектиновыми комплексами. Внутривенное введение мышам с различными привитыми опухолями флуоресцентно меченных CLT1 и CLT2 приводило к их накоплению

во внеклеточном пространстве опухоли. Отобранные пептиды также специфически связывались с участками повреждений в тканях. Таким образом, такие пептиды могут быть полезны при создании адресных лекарственных средств для диагностики и терапии опухолей и поврежденных тканей [43].

Впервые возможность отбора специфических пептидов скринингом фаговой пептидной библиотеки *in vivo* показали Pasqualini и Ruoslahti в 1996 г. [44]. При скрининге *in vivo* существует несколько способов введения фаговой пептидной библиотеки экспериментальным животным. Наиболее распространено внутривенное введение, которое позволяет практически моментально «представить» библиотеку рецепторам кровеносных сосудов, органам и тканям. В процессе циркуляции фаговой пептидной библиотеки в кровяном русле часть популяции фагов связывается с белками плазмы и с другими нецелевыми органами и тканями. Эта часть библиотеки не попадает в дальнейшие раунды селекции, поскольку амплифицируется только та часть библиотеки, которая связалась с целевым органом.

Однако внутривенный способ введения затрудняет проведение отбора пептидов, специфичных к структурам головного мозга, поскольку проникновение фаговых частиц ограничено гематоэнцефалическим барьером. С этой целью разработан интраназальный способ введения фаговой пептидной библиотеки. Установлено, что при интраназальном введении большая часть вещества всасывается в кровь, меньшая – при помощи перинеурального транспорта по чувствительным нервам через нейроны обонятельного тракта попадает непосредственно в мозг и распространяется по структурам головного мозга при помощи механизмов, не связанных с кровотоком [45, 46]. Тем не менее внутривенный способ введения фаговой пептидной библиотеки позволяет отбирать пептиды, специфичные непосредственно к гематоэнцефалическому барьеру [47]. Такие пептиды потенциально могут транслоцироваться на внутреннюю сторону гематоэнцефалического барьера и обеспечивать доставку связанных с ними молекул к структурам мозга.

Альтернативой внутривенному и интраназальному способам является введение непосредственно в мишень (ортотопическое). Например, внутрибрюшинное введение фаговой пептидной библиотеки мышам с раком желудка позволило отобрать пептиды, специфически связывающиеся с метастазами рака желудка [48]. Ортоотопическое введение позволяет представлять мишени все возможные варианты библиотеки и уменьшает вероятность захвата фаговых частиц другими органами. С другой стороны, при внутривенном введении пептидов, отобранных

ортотопически, таргетность таких пептидов резко снижается.

Наконец, существует трансдермальный способ введения, позволяющий отбирать пептиды, способные проникать через интактную кожу [49, 50].

Основные ограничения скрининга *in vivo* – неспецифическое распределение фаговых частиц по органам и тканям и время полужизни введенного фага. Показано, что при циркуляции в организме фаг накапливается в значительном количестве в печени и селезенке. В крови мышей с интактной иммунной системой (линия CF-1) максимальная концентрация фага M13 дикого типа наблюдается через 5 мин с момента внутривенного введения и через 15 мин – в крови мышей с иммунодефицитом. Затем концентрация фаговых частиц в кровяном русле достаточно быстро снижается. Важно отметить, что концентрация фаговых частиц в селезенке мышей с иммунодефицитом гораздо ниже, чем у здоровых, что говорит об участии иммунной системы, в частности, ретикулоэндотелиальной системы, в захвате фагов [51]. Время полужизни фага M13 дикого типа в кровяном русле мышцы составляет около 4.5 ч, при этом различные модификации фаговых частиц (например, гликозилирование или сукцинирование) резко сокращают (до нескольких минут) время полужизни. Сокращение времени полужизни в кровяном русле и быстрая деградация модифицированных фагов связаны, по-видимому, с их взаимодействием с соответствующими рецепторами и интернализацией внутрь клетки [52]. Эти нюансы необходимо учитывать при построении и анализе экспериментов *in vivo*.

В 2002 г. опубликовали результаты первого скрининга фаговой пептидной библиотеки, проведенного *in vivo* на пациенте в коже [53]. После внутривенного введения такой библиотеки (один раунд скрининга) анализировали биопсийный материал нескольких органов. Показано, что распределение 47160 фаговых клонов между органами не случайно. Этот эксперимент стал первым шагом в создании «молекулярной карты» распределения рецепторов человека. Один из отобранных экспонированных пептидов обладал высокой тропностью к ткани предстательной железы и накапливался в ней в значительных количествах. Позже показали, что этот пептид является лигандом интерлейкина-11 [54].

В дальнейшем фаговые частицы, отобранные из биопсийного материала различных органов после первого раунда селекции, объединили в новую библиотеку. С помощью этой библиотеки провели еще два последовательных раунда селекции на двух больных раком предстательной железы. Биоинформатический анализ клонов, отобранных

из различных органов, выявил 15 пептидов, которые потенциально могут служить лигандами определенных рецепторов. С помощью биоинформатических методов (High-throughput analysis by similarity search, protein arrays) и аффинной хроматографии доказано, что четыре из этих 15 пептидов являются лигандами аннексинов А2 и А4, аполипопротеина Е3 и протеазы-3 лейкоцитов [55].

Таким образом, одно из главных преимуществ использования системы *in vivo* – то, что мишени, к которым отбирают специфические пептиды, представлены в естественном микроокружении живого организма.

### ПРИМЕНЕНИЕ ОРГАНО- И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Развитие технологии получения органо- и тканеспецифических пептидов с помощью фаговых библиотек и обнаружение новых свойств таких пептидов позволило рассматривать их как перспективные диагностические и терапевтические средства.

#### Пептиды с противоопухолевой активностью

В большинстве случаев скрининг фаговых пептидных библиотек проводят с целью получения пептидов, которые специфически связываются с рецепторными структурами целевого органа или ткани и впоследствии могут служить адресным агентом для доставки различных веществ. С другой стороны, сами органо- и тканеспецифические пептиды обладают определенными биологическими свойствами. В частности, некоторые пептиды проявляют противоопухолевую активность.

Например, пептид LuP-1, специфически связывающийся с лимфатическими сосудами некоторых опухолей, при систематическом внутривенном введении ингибирует рост рака молочной железы MDA-MB-435 человека в модельных мышах с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Показано, что LuP-1 вызывает апоптотическую гибель только тех клеток, с которыми связывается [56].

Циклический пептид CIGB-300 блокирует фосфорилирование серин-треониновой протеинкиназы СК2, синтез которой значительно повышен при различных видах рака. Нарушение функции этого фермента приводит к торможению роста и индукции апоптоза раковых клеток в культуре. Показано также, что CIGB-300 обладает значительным противоопухолевым эффектом как при местном, так и при системном введении мышам с сингенными опухолями и с опухолями человека и может служить основой для создания противоопухолевого препарата [57].

Пептид SMSIASPYIALE (пептид РIII), специфичный к эндотелиальным клеткам GC9811-Р рака же-

лудка, накапливающийся в метастазах этой опухоли, был отобран из фаговой пептидной библиотеки после четырех раундов селекции. Синтетический аналог РIII значительно ингибировал способность клеток GC9811-Р к адгезии и инвазии, тормозил развитие метастазов и увеличивал продолжительность жизни мышей с привитой раковой опухолью желудка [58]. В дальнейшем получили пептид GMBP1, который специфически связывался с рецепторами клеток рака желудка, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, способствовал изменению фенотипа клеток и восстановлению чувствительности к лекарственным средствам [59].

Известно, что кислый фактор роста фибробластов (aFGF) продуцируется клетками рака молочной железы и, взаимодействуя с рецептором FGF (FGFR), способствует опухолевой прогрессии. Пептид AP8, полученный из фаговой пептидной библиотеки, способен специфически связывать aFGF и ингибировать пролиферацию клеток опухоли и новообразованных опухолевых сосудов, блокируя клеточный цикл [60]. Такие бифункциональные пептиды, специфичные к опухолевым клеткам и клеткам сосудов опухоли, могут быть как самостоятельными противоопухолевыми средствами, так и средствами доставки других лекарственных препаратов, усиливая их эффект собственным противоопухолевым действием.

Wang H. и соавт. разработали стратегию совместного использования апоптотического пептида AVPI и ДНК гена, кодирующего белок p53, для адъювантной терапии рака молочной железы. AVPI-пептид модифицировали, добавив к нему восемь остатков аргинина. Благодаря положительно заряженному «хвосту» из остатков аргинина AVPIR8 приобрел способность эффективно проникать в раковые клетки, а также служить вектором для доставки генов за счет образования нанокомплексов с нуклеиновой кислотой. Использование комбинации AVPIR8/ДНК p53 значительно увеличивало чувствительность раковых клеток к доксорубину в экспериментах *in vitro*, а также на мышинных моделях рака молочной железы с фенотипом множественной лекарственной устойчивости [61].

На основе опухоль-адресованных пептидов разработан ряд перспективных противоопухолевых лекарственных средств. Можно привести несколько примеров противоопухолевых пептидов, находящихся на различных стадиях клинических испытаний ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Так, например, циклический пептид [Arg-Gly-Asp-Dphe-(NMeVal)], содержащий мотив RGD, является основой противоопухолевого средства Циленгитид (Cilengitide). Циленгитид – высокоселективный ингибитор интегрина, подавляющий ангиогенез, рассматривают

как препарат против опухолей центральной нервной системы, в частности глиобластом, а также мелко-клеточного рака легкого, рака предстательной железы и метастазирующего и/или плоскоклеточного рака головы и шеи. В клинических испытаниях (фаза I/II) циленгитида в комбинации со стандартной радиотерапией и темозоломидом, проводимых на пациентах с впервые диагностированной глиобластомой, показано достижение первичной конечной точки (69% выживаемость без прогрессирования в течение 6 месяцев) [62, 63].

Клинические испытания противоопухолевого лекарственного средства NGR-hTNF, состоящего из аминокислотного мотива NGR, мишенью которого является аминопептидаза N (CD13), и человеческого фактора некроза опухолей (hTNF), начались после получения обнадеживающих результатов противоопухолевой терапии на животных моделях [64]. К настоящему времени проведены клинические испытания (II фаза) NGR-hTNF как препарата монотерапии при мезотелиоме плевры и раке печени. Клинические испытания (I/II фаза) комбинации NGR-hTNF с такими препаратами, как доксорубин, оксалиплатин, капецитабин, гемцитабин и т.д., при рецидиве рака яичников, колоректального рака и мелкоклеточного рака легкого находятся на разных стадиях завершения [5, 63]. По результатам клинических исследований NGR-hTNF наиболее эффективен в комбинации с традиционными химиопрепаратами.

В качестве средства от рака яичников и рецидивов глиобластомы проводятся клинические испытания (фаза II/III) онколитического аденовируса Ad5-Δ24-RGD, модифицированного RGD и способного реплицироваться в клетках, в которых отсутствует сигнальный путь Rb/p16 [5].

Обнадеживающие результаты уже завершённых и проводимых в настоящее время клинических исследований позволяют надеяться на то, что в ближайшее время появятся лекарственные средства на основе опухолеспецифических пептидов.

### Использование пептидов в генной терапии

Опухолеспецифические пептиды активно используются в качестве адресующих составляющих при создании направленных генно-терапевтических препаратов. Например, встроенные в мембрану липосомы, «нагруженные» нуклеиновой кислотой пептиды обеспечивают дополнительную адресацию структур доставки. В работе Yang Z. и соавт. в состав липосом были включены два рецепторспецифичных пептида: Angiorep и tLyP-1. Angiorep специфичен к рецептору липопротейнов низкой плотности, экспрессия которого повышена на структурах гематоэнцефа-

лического барьера. tLyP-1 специфичен к рецептору нейролипина-1, он эффективно проникает в паренхиму опухоли. Такие модифицированные липосомы, «нагруженные» миРНК, подавляющей экспрессию гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF siРНК), эффективно трансфицировали клетки глиобластомы человека U87MG в системе *in vitro* и снижали экспрессию гена-мишени. В системе *in vivo* на глиобластоме U87MG в модели ксенографтов показана противоопухолевая активность созданных модифицированных липосом [65].

Вектор на основе адено-ассоциированного вируса (AAV), в капсид которого встроен пептид, отобранный из фаговой пептидной библиотеки и содержащий NGR-мотив, обладал способностью адресно доставлять генетическую информацию к CD13+ клеткам-мишеням. Рецептор CD13 экспрессируется на клетках эндотелия новообразованных сосудов и многих раковых клетках, таким образом, пептиды, содержащие NGR-мотив, могут использоваться как опухолеадресующие агенты [66].

В качестве средства направленной генной терапии также могут применяться генетически модифицированные бактериофаги, экспонирующие адресные пептиды в составе одного из своих поверхностных белков. К важным преимуществам бактериофагов относятся их безопасность для человека, высокая стабильность фаговых частиц и «пластичность» генома для конструирования [67, 68].

Одна из первых работ, доказавшая возможность направленной генной терапии с помощью модифицированных бактериофагов, выполнена на нитчатом бактериофаге, в состав минорного белка рIII которого был введен фактор роста фибробластов (FGF2). В качестве репортерного гена использовали ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) под ранним промотором цитомегаловируса (CMV). Модифицированные бактериофаги специфически проникали только в те клетки, на поверхности которых экспрессировался рецептор FGF2, и интернализировались внутрь клетки. При этом наблюдалась экспрессия репортерного гена и синтез GFP [69]. Таким образом, бактериофаг, несмотря на отсутствие тропизма к клеткам человека, может быть модифицирован таким образом, что приобретает специфичность к определенному типу клеток и способность доставлять чужеродный генетический материал.

Бактериофаг M13, экспрессирующий опухолеспецифический пептид RGD4C, использовали для доставки трансгенной кассеты, регулируемой промотором CMV и фланкированной инвертированными концевыми повторами AAV2. Для улучшения трансфекционных свойств фаговые частицы модифицировали катионными полимерами. Модифицированные

фаговые частицы обладали более высокой противоопухолевой активностью по сравнению с немодифицированными [70].

Наконец, опухолеспецифический пептид можно ковалентно присоединить к терапевтической нуклеиновой кислоте для ее доставки к мишени. Например, изучали возможность доставки миРНК VEGFR2, ковалентно связанной с адресным пептидом cRGD. cRGD специфически связывается с  $\alpha v\beta 3$ -рецепторами, которые экспрессируются с высокой плотностью на эндотелии опухолевых сосудов и самих клетках опухоли. Показано, что ковалентный комплекс cRGD-миРНК специфически проникает в  $\alpha v\beta 3$ -позитивные клетки HUVEC и вызывает «выключение» гена-мишени. В экспериментах *in vivo* на мышах с иммунодефицитом и привитой опухолью рака легкого A549 выявлен специфический противоопухолевый эффект рассмотренных конструкций [71].

Полученные положительные результаты позволяют рассматривать опухолеспецифические пептиды в качестве перспективной платформы для создания средств направленной генной терапии.

#### Адресные пептиды в диагностике заболеваний

Пептиды, специфически связывающиеся с определенными органами и тканями, клетками и сосудами опухолей, могут быть использованы для характеристики культур клеток, визуализации определенных структур (в том числе опухолей) *in vivo* и диагностики заболеваний [72].

Например, RGD-пептид, конъюгированный с FITC, используют в экспериментах *in vitro* для оценки уровня экспрессии интегринов  $\alpha v\beta 3$  на различных раковых клетках в культуре. Окрашивание биоптатов опухолей человека, заключенных в парафин, с помощью FITC-RGD позволяет оценить  $\alpha v\beta 3$ -профиль опухолевой ткани. Этот метод окрашивания гораздо проще и дешевле, чем окрашивание с помощью антител к  $\alpha v\beta 3$ -рецепторам [73].

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – радионуклидный томографический метод диагностического исследования. В основе этого метода лежит детекция распределения в организме соединений (радиофармацевтиков), меченных позитронизлучающими радиоизотопами. В качестве белковых меток в ПЭТ применяют в основном природные пептиды (бомбезин, соматостатин) [74]. Опухолеспецифические пептиды также могут использоваться в качестве направляющих агентов для доставки радионуклидных меток при диагностике злокачественных новообразований. В настоящее время клинические испытания проходят новые радиофармацевтики, созданные на основе RGD-пептида [75].

Другой радиофармацевтик для ПЭТ создан на основе меченного  $^{64}\text{Cu}$  NGR-содержащего пептида, специфического к рецептору CD13. Этот препарат связывался с CD13<sup>+</sup> клетками HT-1080 и не проявлял тропности к CD13<sup>-</sup> клеткам MCF-7 в экспериментах *in vitro*. Результаты опытов *in vitro* подтверждены в системе *in vivo* с использованием ксенографтов опухолей HT-1080 и MCF-7 [76].

Опухолеспецифические пептиды могут быть конъюгированы не только с радионуклидами, но и с другими диагностическими препаратами, например, с парамагнетиками для проведения МРТ (магнитно-резонансная томография) или ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) или с флуоресцентными красителями в случае ФОТ (флуоресцентная оптическая томография) [74]. Такие конъюгаты избирательно накапливаются в опухоли в концентрациях, значительно превышающих их концентрацию в других органах, тем самым усиливая сигнал, детектируемый прибором.

Таким образом, опухолеспецифические пептиды обладают значительным потенциалом для усовершенствования уже существующих технологий диагностики и визуализации опухолевых структур.

#### Пептиды – адресные агенты для доставки лекарственных препаратов

Один из примеров использования опухолеспецифических пептидов для доставки проапоптотических белков – белок, объединяющий проапоптотический пептид KLAК и адресный пептид RGD. RGD-мотив в составе пептида узнает интегриновые рецепторы, которые в большом количестве экспрессируются на новообразованных сосудах и раковых клетках [77]. Полученный бифункциональный белок специфически связывается с клетками-мишенями (клетки эндотелия опухоли), проникает внутрь клеток и индуцирует в них апоптоз по митохондриальному пути [78].

В качестве адресного агента для доставки проапоптотического белка KLA был предложен также пептид M2per, который специфически связывается с опухоль-ассоциированными макрофагами и макрофагами M2 мыши [79]. Опухоль-ассоциированные макрофаги играют важную роль в развитии опухоли, стимулируя рост опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование, и способствуют развитию лекарственной устойчивости [80]. Полученный рекомбинантный белок M2perKLA тормозил развитие опухоли и сокращал популяцию опухоль-ассоциированных макрофагов [79].

При селекции пептидов с помощью пептидной фаговой библиотеки на основе фага T7 был отобран пептид CRGDKG-PDC (iRGD), объединяющий свой-

ства двух мотивов – RGD (интегринсвязывающий) и R/KXXR/K (нейропилин (NRP)-связывающий) [81, 82]. RGD направляет пептид к опухоли, а R/KXXR/K увеличивает проницаемость сосудов опухоли и повышает эффективность доставки лекарственных агентов в паренхиму опухоли через сосудистый барьер. Кроме того, iRGD ингибирует спонтанное метастазирование у мышей. При этом антиметастатическая активность обеспечивается нейропилинсвязывающим RXXK, а не интегринсвязывающим RGD-мотивом [83]. Такие пептиды, обладающие адресующими свойствами и одновременно способные глубоко проникать в паренхиму опухоли, образуют отдельный класс пептидов – CPHP (cell penetrating homing peptides) [84].

Показано, что конъюгат iRGD с противоопухолевым препаратом абраксаном (стабилизированный альбумином паклитаксел) увеличивает эффективность действия абраксана и значительно снижает общую токсичность препарата [85, 82]. Кроме того, оказалось, что совместное введение iRGD-пептида с различными лекарственными препаратами (доксорубин, абраксан, липосомы с доксорубином, трастузумаб) увеличивает эффективность проникновения лекарственных средств в паренхиму опухоли и их терапевтический индекс [86].

Таким образом, короткие адресные пептиды, отобранные из фаговых библиотек, находят все большее применение как в диагностике, так и в клинической практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скрининг фаговых пептидных библиотек – быстрый и удобный метод получения органо-, ткане- и опухолеспецифических пептидов. Безопасность бактериофагов для человека и простота манипуляций с ними позволили получить огромное количество разнообразных адресных пептидных лигандов. Некоторые из них проходят клинические испытания, причем

как в качестве самостоятельных терапевтических средств, так и в качестве агентов, доставляющих лекарственные препараты к органам и тканям-мишеням.

Большой интерес вызывает возможность применения опухоль-адресованных пептидов в диагностике и терапии злокачественных новообразований. Небольшие размеры адресных пептидов позволяют им глубоко проникать в паренхиму опухоли, что важно для таргетной терапии [87, 88]. Короткие пептиды практически неиммуногенны, что делает их безопасными для клинического применения [89]. Пептиды можно легко модифицировать, например, защитой N- и C-концов от протеолитической дегградации [87]. Химический синтез коротких пептидов гораздо дешевле производства моноклональных антител и рекомбинантных белков, а конечный продукт не требует дополнительной очистки от компонентов клеточной стенки бактерий или плазматической мембраны эукариот [90].

Опухолеспецифические пептиды являются «ключами» к огромному массиву информации об изменениях, происходящих в клетке при канцерогенезе, о механизмах, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и метастазирование раковых клеток. Идентификация мишеней таких пептидов представляет очень важную, но часто достаточно нетривиальную задачу. При этом опухолеспецифический лиганд может быть использован для адресной доставки диагностических и лекарственных средств даже при отсутствии информации о мишени. ●

*Работа поддержана Минобрнауки России (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.607.21.0063, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0063).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wicki A., Witzigmann D., Balasubramanian V., Huwyler J. // J. Control Release. 2015. V. 200. P. 138–157.
2. Ruoslahti E. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. № 2. P. 83–90.
3. Arachchige M.C., Reshetnyak Y.K., Andreev O.A. // J. Biotechnol. 2015. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.009.
4. Smith G.P. // Science. 1985. V. 228. № 4705. P. 1315–1317.
5. Bábíčková J., Tóthová L., Boor P., Celec P. // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. № 8. P. 1247–1259.
6. Nicastro J., Sheldon K., Slavcev R.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 7. P. 2853–2866.
7. Gamkrelidze M., Dąbrowska K. // Arch. Microbiol. 2014. V. 196. № 7. P. 473–479.
8. Teesalu T., Sugahara K.N., Ruoslahti E. // Meth. Enzymol. 2012. V. 503. P. 35–56.
9. Ebrahimzadeh W., Rajabibazl M. // Curr. Microbiol. 2014. V. 69. № 2. P. 109–120.
10. Rakonjac J., Bennett N.J., Spagnuolo J., Gagic D., Russel M. // Curr. Issues Mol. Biol. 2011. V. 13. № 2. P. 51–76.
11. King A.M.Q., Adams M.J., Lefkowitz E.J. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2012.
12. Marvin D.A., Symmons M.F., Straus S.K. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2014. V. 114. № 2. P. 80–122.
13. Fagerlund A., Myrset A.H., Kulseth M.A. // Meth. Mol. Biol. 2014. V. 1088. P. 19–33.

14. Rakonjac J, Feng Jn., Model P. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 5. P. 1253–1265.
15. Hoffmann-Thoms S., Weininger U., Eckert B., Jakob R.P., Koch J.R., Balbach J., Schmid F.X. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 18. P. 12979–12991.
16. Zeri A.C., Mesleh M.F., Nevzorov A.A., Opella S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 11. P. 6458–6463.
17. Marvin D.A., Welsh L.C., Symmons M.F., Scott W.R., Straus S.K. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 355. № 2. P. 294–309.
18. Iannolo G., Minenkova O., Petruzzelli R., Cesareni G. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. № 4. P. 835–844.
19. Kay B.K., Kasanov J., Yamabhai M. // *Methods.* 2001. V. 24. № 3. P. 240–246.
20. Bratkovic T. // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. № 5. P. 749–767.
21. Gupta A., Shrivastava N., Grover P., Singh A., Mathur K., Verma V., Kaur C., Chaudhary V.K. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. e75212.
22. Qi H., Lu H., Qiu H.J., Petrenko V., Liu A. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 417. № 3. P. 29–43.
23. Prisco A., De Berardinis P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 4. P. 5179–5194.
24. Sartorius R., Bettua C., D'Apice L., Caivano A., Trovato M., Russo D., Zanoni I., Granucci F., Mascolo D., Barba P., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. № 9. P. 2573–2584.
25. Samoylova T.I., Norris M.D., Samoylov A.M., Cochran A.M., Wolfe K.G., Petrenko V.A., Cox N.R. // *J. Virol. Meth.* 2012. V. 183. № 1. P. 63–68.
26. Parmley S., Smith G. // *Gene.* 1988. V. 73. P. 305–318.
27. Hamzeh-Mivehroud M., Alizadeh A.A., Morris M.B., Church W.B., Dastmalchi S. // *Drug Discov. Today.* 2013. V. 18. № 23–24. P. 1144–1157.
28. Ayat H., Burrone O.R., Sadghizadeh M., Jahanzad E., Rastgou N., Moghadasi S., Arbabi M. // *Biologicals.* 2013. V. 41. № 6. P. 345–354.
29. Brunet E., Chauvin C., Choumet V., Jestin J.L. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 9. e40.
30. Sundell G.N., Ivarsson Y. // *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014:176172.
31. Azzazy H.M., Highsmith W.E. Jr. // *Clin. Biochem.* 2002. V. 35. № 6. P. 425–445.
32. Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 6. P. 849–858.
33. Derda R., Tang S.K., Li S.C., Ng S., Matochko W., Jafari M.R. // *Molecules.* 2011. V. 16. № 2. P. 1776–1803.
34. Noren K.A., Noren C.J. // *Methods.* 2001. V. 23. № 2. P. 169–178.
35. Lang Q., Wang F., Yin L., Liu M., Petrenko V.A., Liu A. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 5. P. 2767–2774.
36. Bedi D., Gillespie J.W., Petrenko V.A. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2014. V. 27. № 7. P. 235–243.
37. Guo Z., Wang X., Li H., Gao Y. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. e76622.
38. Kuramoto K., Yamasaki R., Shimizu Y., Tatsukawa H., Hitomi K. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 537. № 1. P. 138–143.
39. Frascione N., Codina-Barrios A., Bassindale A.R., Taylor P.G. // *Dalton Trans.* 2013. V. 42. № 28. P. 10337–10346.
40. Wang W., Chen X., Li T., Li Y., Wang R., He D., Luo W., Li X., Wu X. // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 8. P. 1156–1164.
41. Krumpe L.R., Mori T. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2006. V. 12. № 1. P. 79–91.
42. Rangel R., Dobroff A.S., Guzman-Rojas L., Salmeron C.C., Gelovani J.G., Sidman R.L., Pasqualini R., Arap W. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 10. P. 1916–1939.
43. Pilch J., Brown D.M., Komatsu M., Järvinen T.A., Yang M., Peters D., Hoffman R.M., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 8. P. 2800–2804.
44. Pasqualini R., Ruoslahti E. // *Nature.* 1996. V. 380. № 6572. P. 364–366.
45. Wan X.M., Chen Y.P., Xu W.R., Yang W.J., Wen L.P. // *Peptides.* 2009. V. 30. № 2. P. 343–350.
46. Chen H., Chen C.C., Acosta C., Wu S.Y., Sun T., Konofagou E.E. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10. e108880.
47. Smith M.W., Al-Jayyousi G., Gumbleton M. // *Peptides.* 2012. V. 38. № 1. P. 172–180.
48. Akita N., Maruta F., Seymour L.W., Kerr D.J., Parker A.L., Asai T., Oku N., Nakayama J., Miyagawa S. // *Cancer Sci.* 2006. V. 97. № 10. P. 1075–1081.
49. Chen Y., Shen Y., Guo X., Zhang C., Yang W., Ma M., Liu S., Zhang M., Wen L.P. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 4. P. 455–460.
50. Lee N.K., Kim H.S., Kim K.H., Kim E.B., Cho C.S., Kang S.K., Choi Y.J. // *J. Drug Target.* 2011. V. 19. № 9. P. 805–813.
51. Zou J., Dickerson M.T., Owen N.K., Landon L.A., Deutscher S.L. // *Mol. Biol. Rep.* 2004. V. 31. № 2. P. 121–129.
52. Molenaar T.J., Michon I., de Haas S.A., van Berkel T.J., Kuiper J., Biessen E.A. // *Virology.* 2002. V. 293. № 1. P. 182–191.
53. Arap W., Kolonin M.G., Trepel M., Lahdenranta J., Cardó-Vila M., Giordano R.J., Mintz P.J., Ardeli P.U., Yao V.J., Vidal C.I., et al. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. № 2. P. 121–127.
54. Zurita A.J., Troncoso P., Cardó-Vila M., Logothetis C.J., Pasqualini R., Arap W. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 2. P. 435–439.
55. Staquicini F.I., Cardó-Vila M., Kolonin M.G., Trepel M., Edwards J.K., Nunes D.N., Sergeeva A., Efstathiou E., Sun J., Almeida N.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 46. P. 18637–18642.
56. Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J.A., Ruoslahti E.A. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. № 7. P. 751–755.
57. Perea S.E., Reyes O., Baladron I., Perera Y., Farina H., Gil J., Rodriguez A., Bacardi D., Marcelo J.L., Cosme K., et al. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 316. № 1–2. P. 163–167.
58. Bai F., Liang J., Wang J., Shi Y., Zhang K., Liang S., Hong L., Zhai H., Lu Y., Han Y. // *J. Mol. Med. (Berl.)* 2007. V. 2. P. 169–180.
59. Kang J., Zhao G., Lin T., Tang S., Xu G., Hu S., Bi Q., Guo C., Sun L., Han S., et al. // *Cancer Lett.* 2013. V. 339. № 2. P. 247–259.
60. Dai X., Cai C., Xiao F., Xiong Y., Huang Y., Zhang Q., Xiang Q., Lou G., Lian M., Su Z., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 445. № 4. P. 795–801.
61. Wang H., Wang H., Liang J., Jiang Y., Guo Q., Peng H., Xu Q., Huang Y. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. № 10. P. 3352–3360.
62. Stupp R., Weller M. // *Curr. Opin. Neurol.* 2010. V. 23. № 6. P. 553–555.
63. D'Onofrio N., Caraglia M., Grimaldi A., Marfella R., Servillo L., Paolisso G., Balestrieri M.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1846. № 1. P. 1–12.
64. Corti A., Ponzoni M. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1028. P. 104–112.
65. Yang Z., Xiang B., Dong D., Wang Z., Li J., Qi X. // *Curr. Gene Ther.* 2014. V. 14. № 4. P. 289–299.
66. Grifman M., Trepel M., Speece P., Gilbert L.B., Arap W., Pasqualini R., Weitzman M.D. // *Mol. Ther.* 2001. V. 3. № 6. P. 964–975.
67. Larocca D., Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Ravey E.P., Gonzalez A.M., Baird A. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002. V. 3. № 1. P. 45–57.
68. Shoaee-Hassani A., Keyhanvar P., Seifalian A.M., Mortazavi-Tabatabaei S.A., Ghaderi N., Issazadeh K., Amirmozafari N., Verdi J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. e79907.
69. Larocca D., Kassner P.D., Witte A., Ladner R.C., Pierce G.F., Baird A. // *FASEB J.* 1999. V. 13. № 6. P. 727–734.

70. Yata T., Lee K.Y., Dharakul T., Songsivilai S., Bismarck A., Mintz P.J., Hajitou A. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2014. V. 3. e185.
71. Liu X., Wang W., Samarsky D., Liu L., Xu Q., Zhang W., Zhu G., Wu P., Zuo X., Deng H., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 42. № 18. P. 11805–11817.
72. Bakhshinejad B., Sadeghizadeh M. // *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2014. V. 11. № 10. P. 1561–1574.
73. Ji S., Zheng Y., Czerwinski A., Valenzuela F., Pennington M., Liu S. // *Bioconjug. Chem.* 2014. V. 25. № 11. P. 1925–1941.
74. Reubi J.C., Maecke H.R. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. № 11. P. 1735–1738.
75. Haubner R., Maschauer S., Prante O. // *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014:871609.
76. Li G., Wang X., Zong S., Wang J., Conti P.S., Chen K. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. P. 3938–3946.
77. Li Z.J., Cho C.H. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. Suppl 1. S1.
78. Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak R., Rio G.D., Krajewski S., Lombardo C.R., Rao R., Ruoslahti E., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 9. P. 1032–1038.
79. Cieslewicz M., Tang J., Yu J.L., Cao H., Zavaljevski M., Motoyama K., Lieber A., Raines E.W., Pun S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 10. № 40. P. 15919–15924.
80. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. // *Nature.* 2008. V. 454. № 7203. P. 436–444.
81. Teesalu T., Sugahara K.N., Kotamraju V.R., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 38. P. 16157–16162.
82. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P. // *Cancer Cell.* 2009. V. 16. № 6. P. 510–520.
83. Sugahara K.N., Braun G.B., de Mendoza T.H., Kotamraju V.R., French R.P., Lowy A.M., Teesalu T., Ruoslahti E. // *Mol. Cancer Ther.* 2015. V. 14. № 1. P. 120–128.
84. Svendsen N., Walton J.G., Bradley M. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. V. 33. № 4. P. 186–192.
85. Wang X., Li S., Shi Y., Chuan X., Li J., Zhong T., Zhang H., Dai W., He B., Zhang Q. // *J. Control. Release.* 2014. V. 193. P. 139–153.
86. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P., Kotamraju V.R., Agemy L., Greenwald D.R., Ruoslahti E. // *Science.* 2010. V. 328. P. 1031–1035.
87. Aina O.H., Sroka T.C., Chen M.L., Lam K.S. // *Biopolymers.* 2002. V. 66. № 3. P. 184–199.
88. Gao H., Xiong Y., Zhang S., Yang Z., Cao S., Jiang X. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. № 3. P. 1042–1052.
89. Brown K.C. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. № 9. P. 1040–1054.
90. Laakkonen P., Vuorinen K. // *Integr. Biol. (Camb).* 2010. V. 2. № 7–8. P. 326–337.

УДК 591.28

# Метаболизм холестерина мозга и его нарушения: связь с нейродегенерацией и синаптической дисфункцией

А. М. Петров\*, М. Р. Касимов, А. Л. Зефирова

Казанский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра нормальной физиологии, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

\*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.09.2015

**РЕФЕРАТ** Холестерин биологических мембран является не только важным структурным компонентом, но и принимает участие в компарментализации и сигнализации. Особенно высоко содержание холестерина в мозге, где он концентрируется в миелине и синаптических мембранах. Исследования последних лет указывают на особое значение холестерина в осуществлении синаптической передачи, также предполагается наличие взаимосвязей между изменениями гомеостаза холестерина и дисфункциями нервной системы. Нарушение синтеза, утилизации и транспорта холестерина в мозге наблюдается при многих нейродегенеративных заболеваниях. Однако до сих пор непонятно, на каком этапе происходят альтерации метаболизма холестерина и какое место это занимает в патогенезе. Одной из причин когнитивных нарушений и массивной нейродегенерации могут быть процессы, связанные с дефектами синаптической передачи. При этом аномалии в обмене холестерина могут выступать в роли пусковых факторов развития дисбаланса синаптической передачи. В данном обзоре мы сфокусировались на описании гомеостаза мозгового холестерина в норме и при ряде патологий (болезни Гентингтона, Нимана–Пика типа С, синдроме Смита–Лемли–Опица), рассмотрели возможные механизмы влияния мембранного холестерина на синаптические процессы. Нарушения обмена холестерина при болезни Альцгеймера, Паркинсона и расстройствах аутистического спектра будут рассмотрены в следующей статье.

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

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ABC – АТФ-связывающие кассетные транспортеры; ACAT1 – ацетил-СоА-холестерин-ацилтрансфераза; ApoE – аполипопротеин E; BDNF – нейротрофический фактор мозга; ГМГ-СоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА; ГХ – гидроксистерол; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; Dhcr7 – 7-дегидрохолестеролредуктаза; LDL-рецептор – рецептор липопротеинов низкой плотности; LRP – белок, подобный рецептору LDL; LX-рецептор – печеночный рецептор X; МЦД – метил-β-циклодекстрин; CYP46A1 – холестерин-24-гидроксилаза; CYP27A1 – холестерин-27-гидроксилаза; CYP7B1 – оксистерол-7α-гидролаза; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

## БАЛАНС ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГЕ

### Общие сведения об источниках холестерина в мозге

Холестерин – основной липидный компонент мозга (23–25% всего холестерина сосредоточено в мозге), содержание которого поддерживается на уровне 15–30 мг/г ткани, средний показатель в других тканях – 2–3 мг/г [1]. В течение эволюции холестерин приобрел специфические функции в ЦНС. Обогащенные холестерином миелиновые муфты

уменьшают проницаемость для ионов, позволяя электрическим импульсам распространяться вдоль аксонов с высокой скоростью. Изобилие холестерина в синаптических мембранах необходимо для формирования и стабилизации синаптического контакта, осуществления нейротрансмиссии. Продукция холестерина является лимитирующим фактором роста нервных отростков [2, 3].

В клетках млекопитающих холестерин синтезируется при участии более 30 ферментов. Вне ЦНС холестерин образуется как эндогенно (около 50–60%),

так и захватывается из липопротеинов (с усвоенными из пищи липидами), циркулирующих в крови. Однако липопротеины плазмы не проникают (или очень слабо проникают) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), и почти весь (более 95%) холестерин мозга синтезируется *in situ* преимущественно в глиальных клетках [1]. Интенсивное проникновение стеролов из плазмы в мозг наблюдается только при нарушении ГЭБ [4]. Частичное нарушение проницаемости ГЭБ может происходить в процессе старения. Более выраженные повреждения ГЭБ выявлены при нейродегенеративных заболеваниях, что способствует развитию патологии [5, 6]. Так, у мышей с дефицитом перицитов, важного компонента ГЭБ, возникает прогрессирующая с возрастом нейродегенерация [4, 6].

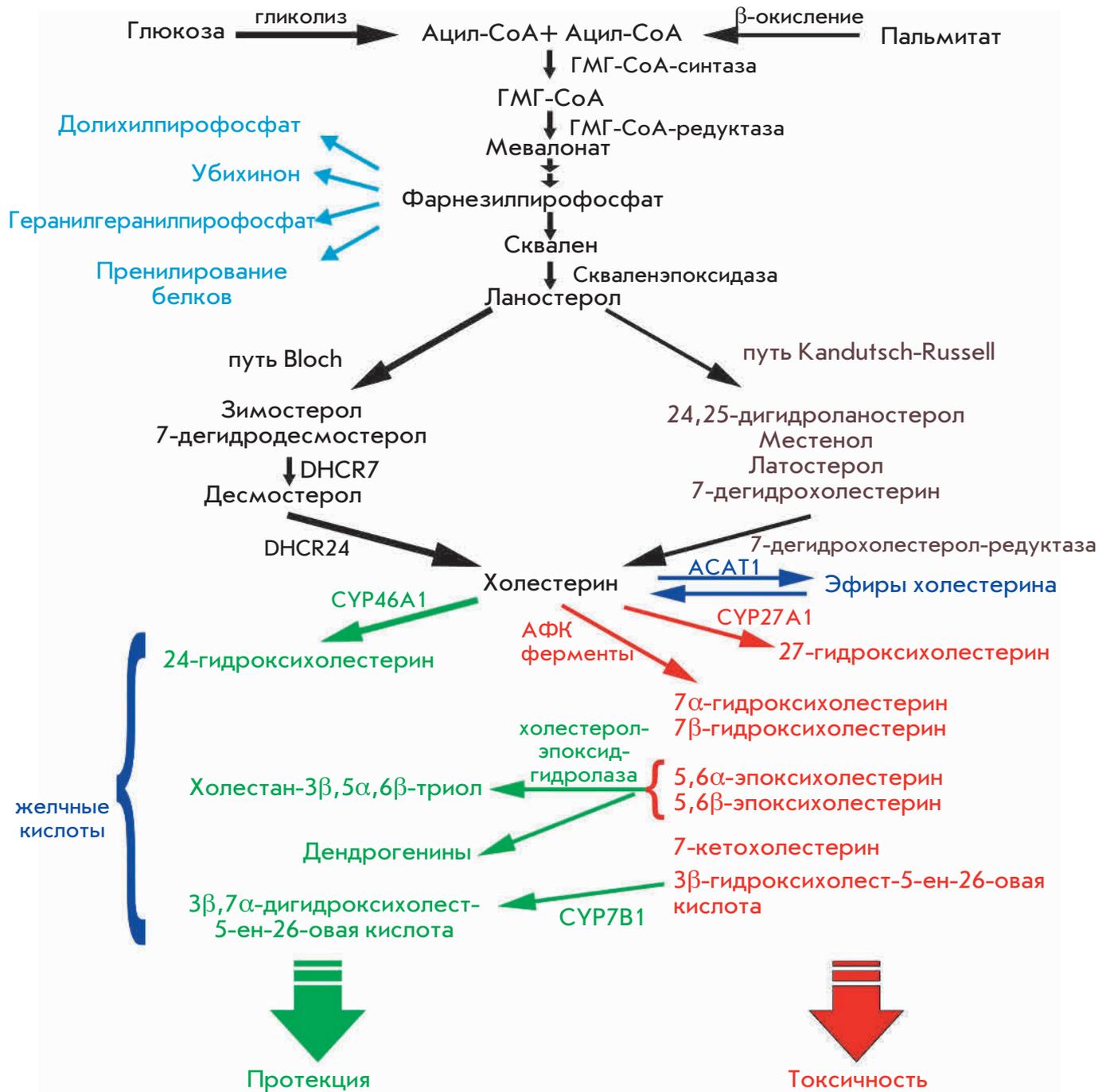
Холестерин мозга сосредоточен в двух основных пулах. Меньший по размеру относительно быстро метаболизирующийся пул (время жизни 5–10 месяцев, 8 мг/г) представлен холестерином плазматических мембран нейронов (10%) и глии (20%). Большая часть (70%) холестерина ЦНС содержится в миелине (40 мг/г) и метаболически стабильна (время жизни ~ 5 лет) [7]. Максимальный синтез холестерина происходит во время активной миелинизации (первые недели–месяцы постнатального развития) мозга олигодендроцитами. При этом олигодендроциты используют для синтеза холестерина кетоновые тела (за счет метаболизирующих кетоны ферментов), концентрация которых в крови на порядок выше в период миелинизации. Если специфично нарушить синтез холестерина в олигодендроцитах, то они начнут захватывать холестерин из внеклеточных источников, но скорость миелинизации будет крайне медленной [8]. После завершения миелинизации синтез холестерина снижается на 90% и в зрелом мозге протекает с низкой интенсивностью преимущественно в астроцитах, а также в 5 раз медленнее – в нейронах [1]. Нейроны производят холестерин, необходимый для выживания, дифференцировки аксонов и дендритов, формирования новых «неэффективных» синапсов. Стимулировать образование холестерина нейронами может нейротрофический фактор мозга (BDNF) [9]. Для масштабного формирования функциональных синапсов (особенно пресинаптических частей, удаленных от сомы) требуется холестерин астроцитарного происхождения. Нейроны в культуре проявляют в 10 раз больше возбуждающей синаптической активности и образуют в 5–7 раз больше синапсов в присутствии астроцитов, что частично связано с продукцией холестерина астроцитами. В целом, продукция холестерина нейронами важна на ранних стадиях развития мозга, тогда как для взрослого организма не требуется синтез холестерина нейронами [1, 7].

### Регуляция синтеза холестерина

Синтез холестерина начинается с превращения ацетил-СоА ферментом ГМГ-СоА-синтетазой в 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА (ГМГ-СоА), который затем конвертируется ГМГ-СоА-редуктазой в мевалонат. Последняя реакция представляет собой лимитирующий и необратимый этап биосинтеза холестерина, который ингибируется статинами. Существуют два пути синтеза холестерина (рис. 1). В нейронах обнаруживаются преимущественно стеролы, принадлежащие к пути Kandutsch-Russell (7-дегидрохолестерин, ланостерол), тогда как в астроцитах – к пути Bloch (десмостерол) [10]. Холестерин синтезируется на территории эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Причем содержание холестерина в ЭПР подвержено более сильным колебаниям, чем в плазматической мембране, и именно от концентрации холестерина в ЭПР зависит его синтез клеткой. ЭПР содержит неактивный связанный с мембраной фактор транскрипции SREBP-2 (белок, связывающий регулируемый стеролами элемент), который взаимодействует с неактивной протеазой SCAP (белок, расщепляющий и активирующий SREBP), содержащей чувствительный к холестерину домен. Когда холестерина много, комплекс SREBP-2/SCAP удерживается в ЭПР молекулами INSIG-1 и -2 (белки 1 и 2, индуцируемые инсулином). При снижении содержания холестерина в ЭПР INSIG отсоединяется от комплекса SREBP-2/SCAP, при этом комплекс направляется в аппарат Гольджи, где SREBP-2 расщепляется протеазой SCAP с образованием активного несвязанного с мембраной N-концевого домена SREBP-2, проникающего в ядро и запускающего экспрессию более 30 генов, содержащих SRE (элемент, регулируемый стеролами) в промоторной области и ответственных за синтез холестерина (рис. 2) [1, 10–12].

При дефиците SCAP содержание холестерина в мозге снижается на 30–40%, что сопровождается нарушением синаптической передачи [13]. Мутация SCAP в астроцитах ведет к микроцефалии, моторным и поведенческим дефектам, которые можно снизить, увеличив потребление холестерина с пищей [14]. Отсутствие SCAP в шванновских клетках вызывает задержку формирования миелина с типичными неврологическими симптомами, тремором и атактической походкой [15]. Блокирование синтеза холестерина снижает экспрессию ряда белков, образующих комплексы с холестерином, например, основных белков миелина [8].

Однажды синтезированный холестерин покидает ЭПР везикулярным и невезикулярным путем (при участии переносчиков) и направляется в плазматическую мембрану, в результате в ЭПР поддержи-



**Рис. 1.** Синтез холестерина и образование оксистеролов. Холестерин образуется из ацетил-СоА в ходе многоступенчатого ферментативного процесса. Известны два пути синтеза холестерина, Bloch и Kandutsch-Russell. Холестерин может депонироваться в виде эфиров или окисляться ферментативным и неферментативным путем с образованием оксистеролов. Описано большое разнообразие оксистеролов, каждый из которых может специфически влиять на клеточные процессы. Подробные объяснения в тексте

вается низкий уровень холестерина. Образование контакта между ЭПР и плазматической мембраной может быть кратчайшим путем транспорта липидов из мест синтеза к поверхности клетки [11, 16].

### Депонирование, эфиры холестерина

В нейронах и других клетках избыток холестерина может превращаться в эфиры холестерина. Во взрослом мозге ~1% холестерина представлен эфирами и входит в состав липидных капель. Кратковременный пик этерификации, которой подвергаются более 5% холестерина, наблюдается в отдельном регионе мозга в начале периода миелинизации. Эфиры холестерина могут служить резервом, который используется при миелинизации и формировании синаптических контактов. Накопление эфиров может быть связано с увеличением активности ацетил-СоА-холестерин-ацилтрансферазы (АСАТ1/СОАТ1), вызванного повышением уровня холестерина в ЭПР. Ингибирование АСАТ1 сильно (на 86%) снижает концентрацию эфиров холестерина. Нейротоксичные компоненты и окислительный стресс, наоборот, увеличивают активность АСАТ1 [17]. АСАТ1 более активна в нейронах, чем в глиальных клетках. Однако в астроцитах АСАТ1 активируется при нарушении выброса холестерина или перегрузки экзогенным холестерином [18]. Основной субстрат для этерификации холестерина поставляется фермент ЭПР стерол-СоА-десатураза, которая катализирует синтез мононенасыщенных жирных кислот из насыщенных жирных кислот [11].

В клетке эфиры холестерина постоянно разрушаются гидролазой. В норме уровень эфиров холестерина в мозге низкий и гидролаза способна превращать их в холестерин. При значительном повышении концентрации эфиров гидролаза «не справляется», и эфиры холестерина образуют липидные капли в цитоплазме нейронов [1].

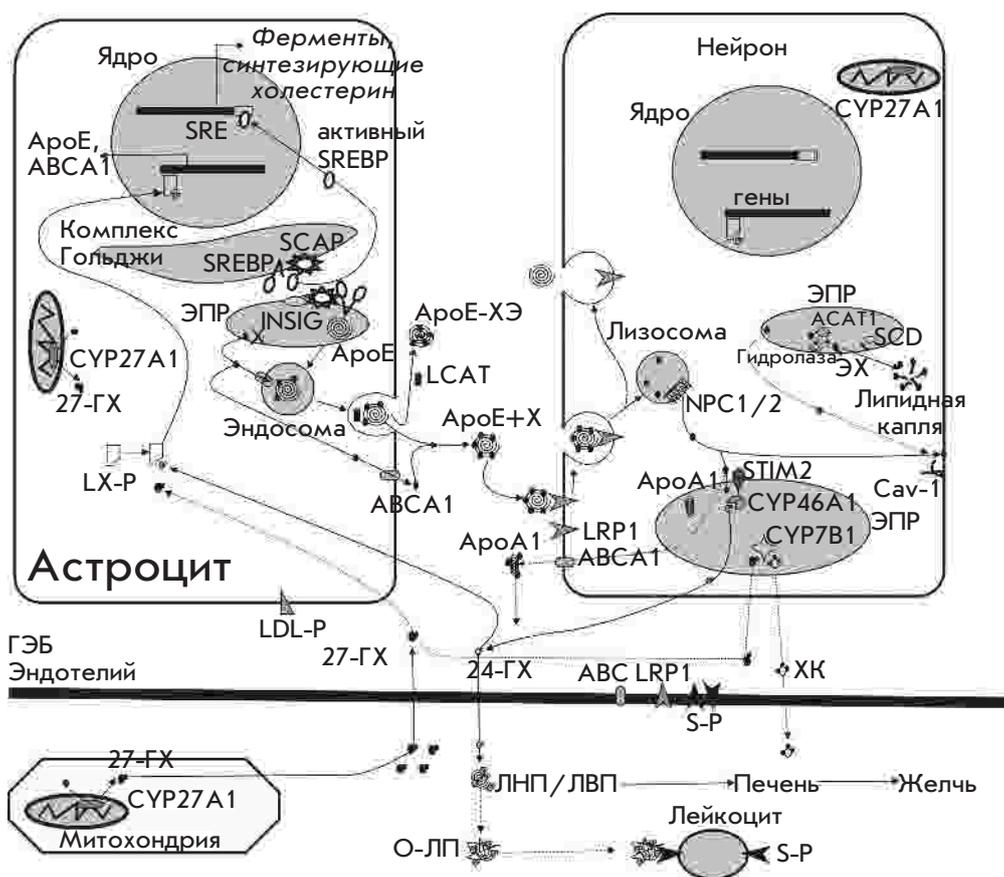
### Межклеточный транспорт холестерина

Для транспорта холестерина мозг использует свои собственные липопротеины, состоящие из апо-липопротеинов (в основном Е, 39 кДа) и липидов. Астроциты – главные продуценты холестерина и аполипопротеина Е (АроЕ), которые вместе с фосфолипидами собираются в липопротеиновые комплексы (АроЕ-частицы) (рис. 2). Сердцевина липопротеиновых частиц собирается в ЭПР, а обогащение липидами и секреция АроЕ-частиц осуществляются с помощью одного или нескольких АТФ-связывающих кассетных транспортеров (АВС), таких, как АВСА1, АВСГ1 и АВСГ4 [19–21]. АВСА1 катализирует начальную стадию переноса липидов на «свободные» аполипопротеины, формируя «рож-

дающиеся» частицы, которые затем полностью «наполняются» липидами и выбрасываются из клетки на второй стадии процесса с участием АВСГ1/АВСА1 [22]. Недостаточно обогащенные липидами частицы (например, при дефиците АВСА1) быстрее катаболизируются, что сопровождается снижением уровня АроЕ в мозге. Инактивация АВСА1 в мозге вызывает астроглиоз и усиление экспрессии воспалительных генов, а также изменяет синаптическую передачу и сенсомоторное поведение [23].

Главными потребителями липопротеинов являются нейроны, которые захватывают липопротеины с помощью рецепторов, принадлежащих к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности: LDL-рецепторы и белки, подобные LDL-рецепторам (LRP, LRP1B, LRP2/мегалин, LRP4, LRP5/6, LRP8/APOER2, LRP11/SORL1). Эти рецепторы связывают также белки, участвующие в развитии мозга (Sonic hedgehog, Wnt, релин), протеазы и ингибиторы протеаз ( $\alpha_2$ -макроглобин), переносчики витаминов, шапероны, медиаторы воспаления [21]. Основным рецептором, опосредующим захват АроЕ-частиц – LRP1, характеризуется высокой транспортной емкостью за счет высокой скорости эндоцитозного рециклирования (рис. 2). LRP1 экспрессируется преимущественно в нейронах, а рецептор LDL – в глии [24]. Делеция LRP1 в нейронах ведет к глобальному нарушению метаболизма холестерина и нейродегенерации [25]. После рецептор-опосредованного эндоцитоза везикулы доставляют липидные частицы в поздние эндосомы/лизосомы. Сразу после эндоцитоза АроЕ отделяется от липидных компонентов и не направляется в лизосомы, а возвращается обратно на поверхность, т.е. подвергается рециклизации (рис. 2) [26]. Холестерин покидает поздние эндосомы/лизосомы при участии белков NPC1 и NPC2 и направляется в плазматическую мембрану или мембрану ЭПР, содержанием холестерина в которой по принципу отрицательной обратной связи (через путь SREBP-2/SCAP/INSIG-1) регулируются гены, вовлеченные в гомеостаз холестерина [16]. Предполагается, что в полости эндолизосомы холестерин связывается с NPC2 (трансмембранный белок), а затем взаимодействует с NPC1 (внутрилюминальный белок). В итоге холестерин оказывается огражденным от водной среды белками NPC1 и NPC2, после чего перебрасывается в ЭПР или плазматическую мембрану [27].

Взаимодействие между АроЕ-частицами и рецепторами запускает пути внутриклеточной сигнализации, что важно для нормального функционирования и выживания нейронов [20, 21]. Например, синтез АроЕ глиальными клетками более чем в 150 раз ускоряет репарацию нерва после повреждения [28].



**Рис. 2.** Метаболизм холестерина в мозге. Нейрон-глиальные отношения. Основное количество холестерина (X) во взрослом мозге продуцируется астроцитами с помощью ферментов эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Синтез холестерина регулируется белками INSIG, SREBP и SCAP. При высоком уровне холестерина все белки удерживаются в составе комплекса в ЭПР, а снижение уровня холестерина вызывает распад комплекса, перемещение SREBP и SCAP в комплекс Гольджи, где протеаза SCAP отщепляет от SREBP активный фактор транскрипции, проникающий в ядро и запускающий экспрессию генов, отвечающих за синтез и транспорт холестерина. На территории ЭПР собирается липопротеиновая частица с ApoE, которая попадает в эндосомы и секретируется во внеклеточную среду. Вновь синтезированный холестерин неvesикулярным путем с помощью АТР-связывающих кассетных транспортеров (ABCA1) переносится из ЭПР в эндосомы или во внеклеточную среду. Инкрустированные холестерином ApoE-частицы взаимодействуют с рецепторами на нейронах (LRP1), захватываются посредством эндоцитоза и направляются в лизосомы/поздние эндосомы. В эндолизосомах холестерин при участии белков NPC1 и 2 перемещается в плазматическую мембрану или в ЭПР. В доставке холестерина в плазматическую мембрану принимает участие кавеолин-1 (Cav-1). В ЭПР находится CYP46A1, окисляющий холестерин до 24-гидроксихолестерина (24-ГХ), способного проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и попадать в циркуляцию, где связывается с липопротеинами низкой и высокой плотности (ЛНП, ЛВП). Избыток 24-ГХ в крови может окислять липопротеины плазмы (О-ЛП), которые с помощью сквенджер-рецептора (S-P) могут накапливаться в лейкоцитах. 24-ГХ связывается с цитоплазматическими LX-рецепторами астроцитов (и нейронов), затем комплекс 24-ГХ/LX-рецептор проникает в ядро и индуцирует экспрессию генов ApoE и ABCA1, способствующих доставке холестерина из астроцитов в нейроны. Часть холестерина в составе комплексов с ApoA1 может выбрасываться из нейронов и перебрасываться через ГЭБ. Избыток холестерина в ЭПР подвергается этерификации при участии фермента ACAT1, образующиеся эфиры холестерина откладываются в виде капель в цитоплазме. Фермент стерол-CoA-десатураза (SCD) поставляет мононенасыщенные жирные кислоты для этерификации холестерина. Образование эфиров холестерина (в составе ApoE-частиц, ApoE-XЭ) во внеклеточной среде связано с ферментом LCAT, секретируемым астроцитами. В митохондриях многих клеток (в частности, макрофагов) присутствует фермент CYP27A1, окисляющий холестерин до 27-гидроксихолестерина (27-ГХ), который может проникать в мозг через ГЭБ и менее эффективный, чем 24-ГХ, активировать LX-рецептор. 27-ГХ может преобразовываться ферментом нейронов CYP7B1 в 7 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-4-холестеновую кислоту (ХК), которая выбрасывается из мозга в циркуляцию. Хотя ГЭБ не пропускает холестерин крови в мозг, эндотелиальные клетки ГЭБ содержат ABC-транспортеры, LRP1 и S-P, что указывает на существование путей взаимного влияния мозгового и периферического холестерина

### Экскреция холестерина из мозга. Оксистеролы

Из организма человека ежедневно выводится около 1 г холестерина: 0,5 г в виде желчных кислот, 0,5 г – как неметаболизированный холестерин или бактериальный метаболит копростанол. В мозге практически отсутствуют механизмы разрушения холестерина. Однако 0,02–0,04% (6–12 мг) холестерина мозга удаляются каждый день [1] преимущественно в форме 24-гидроксихолестерина (24-ГХ, 6–8 мг/день). 24-ГХ (в гомогенате мозга, 30 мкМ) проникает через ГЭБ (диффузией или при участии анионного транспортера, *oatp2*), в крови связывается с липопротеинами низкой плотности, поглощается гепатоцитами и выводится в составе желчи [7]. Небольшая часть холестерина покидает мозг в виде АроЕ/А-частиц через ГЭБ. Экспрессирующийся преимущественно в нейронах ABCA1 способен освобождать избыток холестерина в виде АроА1-частиц, которые перебрасываются через ГЭБ при участии LRP1 и сквенджер-рецептора класса 1 В (SR1B) [29]. Увеличение или снижение экспрессии ABCA1 в нейронах усиливает или снижает выведение холестерина соответственно [20].

24-ГХ продуцируется холестерин-24-гидроксилазой (СУР46А1), которая в норме экспрессируется в телах и дендритах некоторых нейронов (больших пирамидных клетках коры, гиппокампа, миндаля, скорлупы, таламуса, клетках Пуркинью) (рис. 2) [7]. При патологических состояниях и после травмы СУР46А1 может появиться в ненейрональных клетках (астроциты, микроглия, макрофаги) [11]. В мозге 24-ГХ (как и другие оксистеролы) активирует ядерный LX-рецептор астроцитов и нейронов, который усиливает экспрессию белков, обеспечивающих синтез холестерина и его транспорт (ABCA1, АроЕ). Следовательно, увеличение выведения холестерина из мозга способствует его синтезу в астроцитах и доставке нейронам. Повышение же уровня холестерина в ЭПР может стимулировать СУР46А1 [1]. Таким образом, в мозге формируется кругооборот продукции и экскреции холестерина. Если его остановить за счет мутации гена *СУР46А1* (мышь *СУР46А1*  $-/-$ , содержание 24-ГХ у которых составляет 5% от уровня у мышей дикого типа), то концентрация холестерина в мозге не возрастет, так как на 40–50% уменьшится его производство [7]. Сверхэкспрессия *СУР46А1*, увеличивающая продукцию 24-ГХ, также не изменяет уровень холестерина, так как возрастает его синтез [30]. Образование 24-ГХ в нейронах подавляется этерификацией холестерина, поэтому удаление гена *АСАТ1*, на 13% снижающее общее содержание холестерина в мозге, на 32% повышает уровень 24-ГХ [17].

Повышение активности *СУР46А1* наблюдается при стимуляции синаптической передачи. Уже через 30 мин синаптической активности в глутаматер-

гическом синапсе уровень мембранного холестерина немного, но достоверно снижается за счет освобождения 24-ГХ во внеклеточное пространство. При этом СУР46А1 перемещается от ЭПР к плазматической мембране и активируется. Этот процесс зависит от повышения уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  и функционирования чувствительного к  $Ca^{2+}$  белка STIM2 в полости ЭПР [31]. По мере старения, в нейронах повышается продукция активных форм кислорода, которые усиливают экспрессию СУР46А1, в результате чего наблюдается прогрессирующая потеря холестерина синаптическими мембранами [32].

Другой оксистерол – 27-ГХ – главный метаболит холестерина в системной циркуляции, где его концентрация в норме составляет 0,15–0,73 мкМ, а при ряде патологий (например, при атеросклерозе) может достигать миллимолярного уровня [33]. 27-ГХ синтезируется из холестерина митохондриальным ферментом СУР27А1 почти во всех клетках (рис. 2). В нейронах, астроцитах и олигодендроцитах 27-ГХ образуется в очень низкой концентрации и выводится из мозга через ГЭБ [34]. Однако 27-ГХ, продуцируемый периферическими тканями, может проникать в мозг (5 мг/день). В норме соотношение 27-ГХ : 24-ГХ составляет 1 : 8 во фронтальной коре, 1 : 5 в затылочной коре и 1 : 10 в базальных ядрах [35]. Оксистерол-7 $\alpha$ -гидролаза (СУР7В1) катализирует превращение 27-ГХ в 7 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-4-холестеновую кислоту, которая удаляется через ГЭБ [1]. Интенсивное образование 27-ГХ происходит при гиперхолестеринемии и окислительном стрессе [34]. При окислительном стрессе существенная часть холестерина может превращаться в 27-ГХ, который аккумулируется в мозге, увеличивая риск нейродегенерации [33].

Макрофаги могут в значительных количествах производить 25-гидроксихолестерин (25-ГХ) с помощью холестерин-25-гидролазы, локализованной в ЭПР. В тканях (в том числе в мозге) экспрессия этого фермента повышается при индукции врожденного иммунного ответа, а образующийся 25-ГХ оказывает противовирусный эффект и способствует этерификации холестерина за счет усиления активности АСАТ1. В мозге концентрация 25-ГХ составляет примерно 1 мкМ и может локально повышаться при нейродегенеративных заболеваниях. Следует отметить, что синтез следовых количеств 25-ГХ могут катализировать СУР46А1 и СУР27А1, а метаболизируется 25-ГХ при участии СУР7В1 [36].

### ОСТРОВКИ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГЕ

#### Кратко о липидных рафтах

В нервной системе связь между организацией мембраны и клеточными процессами более выражена,

чем в других тканях. Нейроны и в меньшей степени глия – высокополяризованные клетки, содержащие различные мембранные компартменты: аксон, дендриты, синаптические мембраны, миелиновые муфты, перехваты и т.п. Даже внутри отдельного региона мембраны молекулы движутся не свободно, а формируют микродомены, обогащенные холестерином и сфинголипидами (липидные рафты). Холестерин выступает в роли «клея», объединяя липидные и белковые компоненты в микродомен [37]. Сфинголипиды (в частности, гликолипиды) мозга характеризуются высокой степенью структурного разнообразия, и отдельные популяции нейронов, глиальных клеток и разные рафты одной клетки обогащены различными гликолипидами. В ходе развития мозга и дифференцировки нейронов наблюдается увеличение экспрессии и разнообразия гликолипидов [3]. Нарушение синтеза сложных гликолипидов в нейронах вызывает тяжелые неврологические/синаптические нарушения и гибель в течение 3 недель после рождения [38]. В целом, липидный состав рафтов мозга зависит от региона, типа клетки и стадии развития. Отдельные рафты могут включать специфичные белковые компоненты (рецепторы, ионные каналы, белки экзо- и эндоцитоза, ферменты), которые на территории рафта создают сигнальные комплексы/специализированные компартменты [3, 24]. Например, высокое содержание холестерина/рафтов – одна из причин существенно более медленной диффузии многих белков в синаптических сайтах, чем во внесинаптических регионах [39]. Увеличение концентрации холестерина и сфинголипидов усиливает объединение (коалесценцию) рафтов, вызывая появление в мембране больших (микрометровых) стабильных суперрафт-доменов (платформ). В живых клетках липидные платформы могут формироваться за счет сцепления содержащихся в разных рафтах белков при их связывании с одной и той же молекулой внеклеточного лиганда (например, фактора роста) или каркасными белками и белками цитоскелета. Фосфорилирование обычно облегчает слияние белков рафтов за счет усиления белок-белковых взаимодействий. Слияние рафтов имеет значение в мембранном транспорте, в трансдукции сигналов и других процессах [3].

С рафтами ассоциированы многие вовлеченные в сигнализацию белки, в том числе кавеолы, которые имеют каркасный домен, служащий сайтом взаимодействия с метаболитными рецепторами, G-белками, NO-синтазой, аденилатциклазой, фосфоинозитол-3-киназой, MAP-, Src-киназами, протеинкиназами A и C [40]. В нейронах кавеолин-1 локализуется со специфичным каркасным постсинаптическим белком PSD-95, глутаматными NMDA-

рецепторами, а его нокаут вызывает потерю синапсов [41]. Ишемия мозга может разрушать ассоциированные с кавеолинами сигнальные комплексы в нейронах. Высокая экспрессия кавеолина-1 усиливает активность сигнальных молекул, обеспечивающих выживание и рост, делая мозг более устойчивым к ишемическому повреждению [40].

### **Липидные рафты и внутренне неупорядоченные белки**

Белки, у которых отсутствует хорошо определяемая трехмерная структура, относятся к внутренне неупорядоченным белкам. Они составляют часть протеома, называемую *unfoldome*, и зачастую участвуют в сигнализации и мембранном транспорте [42, 43]. В число этих белков входят  $\alpha$ -синуклеин, APP (белок-предшественник амилоида), PrP (прионные белки), белок гентингтин и tau. Конформация этих белков зависит от окружения и может существенно изменяться. При определенных условиях (сверхпродукция, мутации, «пагубное» окружение)  $\alpha$ -синуклеин, APP, PrP могут приобретать «патологическую» трехмерную структуру. Возможно, ведущую роль в превращении нормальных белков в патологические играют мембраны. При оседании на мембранах происходит концентрирование белков, что способствует образованию их агрегатов.  $\alpha$ -Синуклеин, амилоидный пептид  $\beta$  (продукт расщепления APP), PrP взаимодействуют избирательно с липидными рафтами [44], в результате чего изменяется конформация белков, что может ускорять их агрегацию. Амилоидный пептид  $\beta$  узнает специфичные для рафтов гликофинголипиды (ганглиозид GM1, асиалоганглиозид GM1, галактозилцерамид) и холестерин,  $\alpha$ -синуклеин – ганглиозиды GM1 и GM3, PrP – сфингомиелин, галактозилцерамид, ганглиозиды GM1 и GM3 [42]. Эти белки в избытке представлены в синапсах, мембраны которых особенно богаты упомянутыми ганглиозидами [45]. От локальных значений pH, концентрации холестерина, текучести микроучастка зависят сила взаимодействия и тип получающегося агрегата (глобулярная или фибриллярная структура) и, следовательно, его токсичность. Холестерин усиливает/ослабляет связывание этих белков со сфинголипидами, включающими негидроксилированные/гидроксилированные ацильные группы. При увеличении концентрации ганглиозидов GM1, снижении количества холестерина и белков в рафтах амилоидный пептид  $\beta$  связывается с мембраной и образует токсичные фибриллы, тогда как повышение содержания холестерина в мембранах ингибирует агрегацию амилоидного пептида  $\beta$  [46]. Мембраны могут катализировать превращение зрелых амилоидных фибрилл (слабо токсичных) в протофибриллярное

состояние, характеризующееся высокой токсичностью [47], т.е. амилоидные бляшки могут быть нестабильными и при изменении состояния липидных рафтов могут превращаться в источник токсичных протофибрилл. Олигомеры амилоидных пептидов  $\beta$  могут взаимодействовать с белками – резидентами рафтов, такими, как глутаматный NMDA-рецептор, метаботропный глутаматный рецептор 5, PrP. В итоге олигомеры способствуют формированию больших платформ, нарушающих функционирование синаптического аппарата [24, 44]. В целом, сами внутренне неупорядоченные белки потенциально способны изменять структуру рафтов и мембран [42, 43].

### ХОЛЕСТЕРИН И СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА

В самом общем виде механизм передачи информации в синапсе можно представить следующим образом (рис. 3). Пресинаптические нервные окончания содержат большое количество синаптических везикул, заполненных медиатором. В ответ на вызванный потенциалом действия вход  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые Ca-каналы везикулы сливаются с пресинаптической мембраной (экзоцитоз), освобождая медиатор в синаптическую щель. Достигнув постсинаптических рецепторов, медиатор активирует их, в результате изменяется потенциал постсинаптической мембраны. Синаптическая передача – один из самых высокорегулируемых клеточных процессов. Длительные изменения ее эффективности лежат в основе интегративных феноменов и влияют на выживаемость и функционирование нейронов [37].

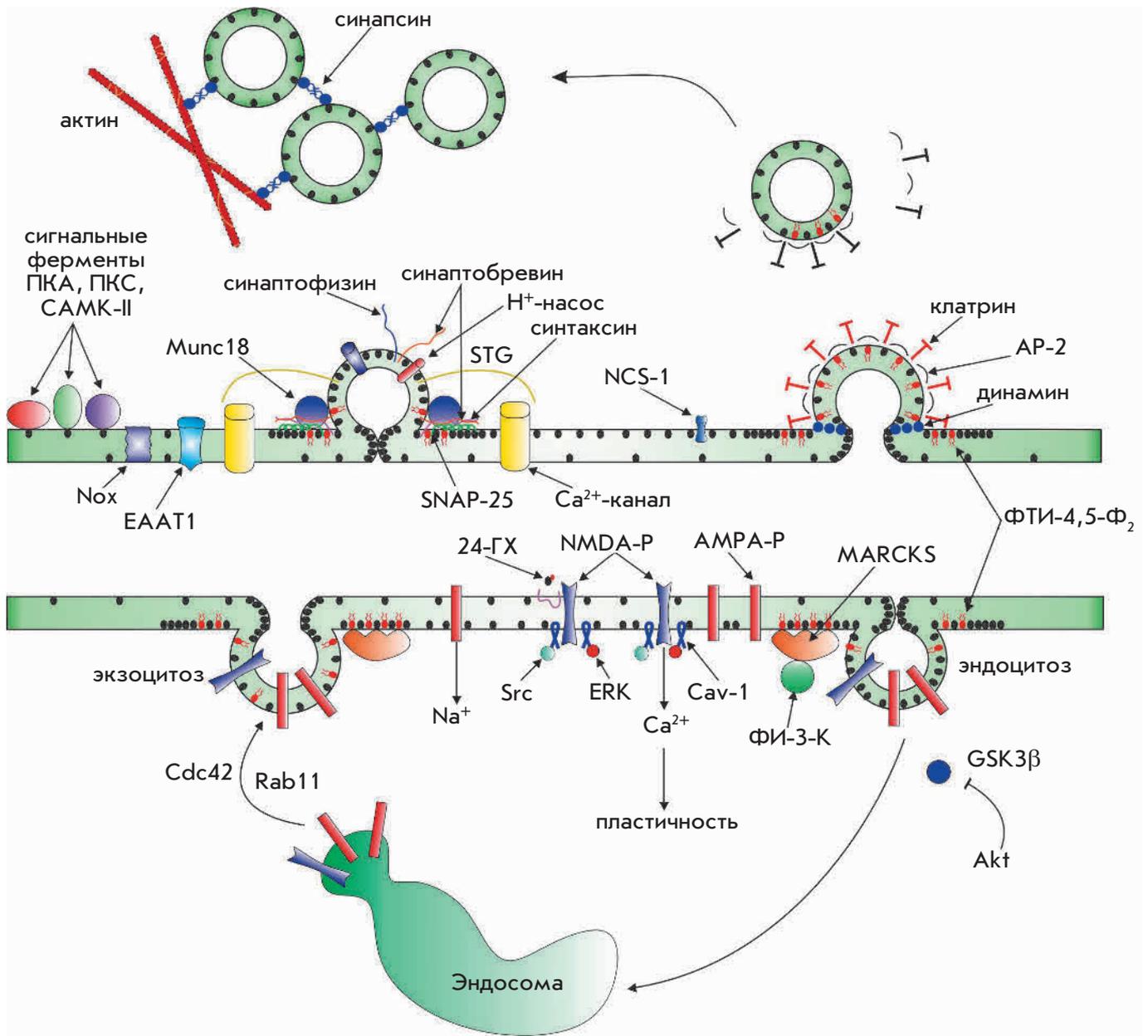
### Пресинаптические механизмы и холестерин

Роль холестерина в пресинаптических процессах, обеспечивающих высвобождение нейромедиатора, связана с его способностью непосредственно влиять на биофизические свойства мембран; прямо взаимодействовать с белками, регулирующими экзо- и эндоцитоз; участием в организации липидных рафтов.

В ходе экзоцитоза происходят радикальные изменения кривизны мембран, которые определяются составом липидов. Холестерин, в большом количестве представленный в синаптических везикулах (40% всех липидов) и пресинаптической мембране, поддерживает формирование сильно искривленных промежуточных мембранных структур в процессе слияния [48]. За счет способности к относительно легкому переходу между монослоями (флип-флопу) холестерин снижает «натяжение» мембран при деформациях, стабилизируя пору слияния. Холестерин способствует слиянию благодаря взаимодействию с везикулярными (синаптофизин) и пресинаптическими (синтаксин-1) белками [37, 49]. В сайтах экзоцитоза и мембранах везикул холестерин участвует

в формировании липидных рафтов [45]. В составе рафтов обнаружены ключевые белки везикул – протонный насос, синаптоагмины, синаптофизины, SV2, а также экзоцитозные белки пресинаптической мембраны – синтаксин, SNAP-25, синаптобревин, Munc18, потенциал-зависимые Ca-каналы [50]. Чем выше содержание белков экзоцитоза в рафтах, тем эффективнее протекает экзоцитоз. Разные изоформы синтаксина холестерин-зависимым образом могут формировать в мембране отдельные скопления. Это предполагает возможность образования сайтов экзоцитоза с различными свойствами [51]. Возможно, экзоцитоз может модулироваться слиянием/разделением отдельных рафтов. Например, с одной стороны, потенциал-управляемые Ca-каналы и SNARE-белки, а с другой, белок NCS-1 (нейрональный сенсор кальция 1), усиливающий активность Ca-каналов, локализуется в разных микродоменах, слияние которых может облегчать экзоцитоз [52]. Мутации в гене синапс-специфичной церамидазы SLAB, приводящие к перераспределению холестерина в пресинаптической мембране, уменьшают на ~70% способность везикул к слиянию. В рафтах могут концентрироваться анионные липиды, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфаты, которые влияют на активность белков экзоцитоза и способность мембраны к деформации [49]. Оксистерол, 5 $\alpha$ -холестан-3-он, нарушающий стабильность синаптических рафтов, угнетает экзоцитоз и ограничивает популяцию синаптических везикул, вовлекаемую в нейротрансдукцию [53]. В целом, удаление даже небольшой фракции холестерина, ослабление его синтеза приводит к угнетению вызванного освобождения медиатора при низкой и высокочастотной активности [54, 55]. Нарушение метаболизма холестерина может нарушать кластеризацию синаптических везикул и угнетать ионные токи, формирующие потенциал действия [56, 57].

Мембранный холестерин избирательно способствует протеканию вызванного экзоцитоза, в то время как спонтанное освобождение нейромедиатора, наоборот, угнетается холестерином [54, 55, 58]. Возможно, холестерин ограничивает спонтанный экзоцитоз, предотвращая избыточную активацию ряда протеинкиназ (в частности, протеинкиназ A, C, CAMK-II) и сигнального пути NADPH-оксидаза-активные формы кислорода-TRPV1-каналы-Ca<sup>2+</sup>-кальцинейрин [58–60]. Поэтому при истощении мембранного холестерина усиливается спонтанный экзоцитоз, в результате может истощаться запас синаптических везикул, происходит десенситизация рецепторов, уменьшаются локальный белковый синтез. Кроме того, снижение содержания холестерина усиливает невезикулярное освобождение нейромедиаторов в периферических и центральных синапсах [61, 62].



**Рис. 3.** Синаптическая передача: липид-белковые взаимодействия. Нейромедиатор освобождается из синаптических везикул, которые сливаются (экзоцитоз) в специализированном участке пресинаптической мембраны, активной зоне, в ответ на вход  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые  $\text{Ca}$ -каналы. Слияние везикул опосредуется белками, формирующими SNARE-комплекс (синаптотобревин, синтаксин, SNAP-25), и регулируется многими холестеринсвязывающими белками (синаптотогамин/STG, Munc18, NCS-1) и сигнальными молекулами (протеинкиназами, NADPH-оксидазой/Nox). После слияния белковые и липидные компоненты везикул подвергаются клатрин-опосредованному эндоцитозу. Большая часть синаптических везикул формирует резервный пул, который освобождает нейромедиатор только в период длительной синаптической активности. Доставка этих везикул в сайты экзоцитоза зависит от актина и синапсина. В глутаматергическом синапсе освобождающийся нейромедиатор изменяет  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -проводимость постсинаптической мембраны, активируя AMPA/NMDA-рецепторы. Количество постсинаптических рецепторов зависит от экзо- и эндоцитозного трафика рецепторов, который управляется малыми GTP-азами (Rab11) и киназами (Cdc42, GSK3 $\beta$ , фосфоинозитол-3-киназа/ФИ-3-К). Зависимая от рецепторов сигнализация связана со многими белками (Src, ERK, Cav-1). На схеме изображены молекулы холестерина (черные) и их скопления, фосфоинозитол-4,5-бисфосфаты (ФИ-4,5- $\text{F}_2$ , красные), и белки, взаимодействующие с холестерином и ФИ-4,5- $\text{F}_2$ . Подробные объяснения в тексте

**Эндоцитоз синаптических везикул.** Эндоцитоз синаптических везикул предотвращает истощение их запаса при синаптической активности. После эндоцитоза везикулы заполняются нейромедиатором и доставляются в соответствующий пул. Холестерин может требоваться для облегчения инвагинации мембраны при эндоцитозе [37, 49]. Участки мембраны, обогащенные холестерином, способны активировать белки, участвующие в эндоцитозе [50]. Не исключено, что рафты в мембранах везикул предотвращают смешивание везикулярных белков с пресинаптическими, упрощая их сортировку в ходе эндоцитоза [45]. Фосфоинозитиды рафтов вовлечены в запуск эндоцитоза и кластеризацию везикулярных белков [49]. Удаление даже небольшого количества холестерина из мембран везикул ведет к блокированию эндоцитоза и накоплению мембранного материала везикул в плазматической мембране [54, 62].

### Постсинаптические процессы и холестерин

Изменения в количестве/составе постсинаптических рецепторов требуются для феномена синаптической пластичности. Подобные изменения происходят за счет эндо- и экзоцитоза рецепторов, их латеральной диффузии между экстра- и синаптическими участками (рис. 3). Транспорт рецепторов контролируется как взаимодействием рецепторов с каркасными белками, так и липидным составом мембраны [3]. Активность рецепторов и последующая сигнализация также часто зависят от содержания мембранного холестерина. Многие из постсинаптических рецепторов локализируются в рафтах [2, 3, 11, 12]. В целом, постсинаптическая плотность – массивный мультибелковый комплекс, включающий молекулы, участвующие в постсинаптической сигнализации и пластичности, физически ассоциирована с рафтами [39, 63]. В представленном обзоре мы уделим внимание только глутаматным AMPA- и NMDA-рецепторам.

Быстрое удаление холестерина подавляет токи через AMPA-рецепторы и их встраивание путем экзоцитоза [64]. Удаление холестерина/сфинголипидов в течение длительного времени увеличивает конститутивный эндоцитоз AMPA-рецепторов [63]. В нейронах с уровнем холестерина, сниженным (~ на 25%) в ходе естественного старения, наблюдается накопление AMPA-рецепторов на поверхности клетки вследствие нарушения их эндоцитоза и латеральной мобильности. Предполагается, что потеря холестерина ведет к отсоединению белка MARCKS от фосфоинозитол-4,5-бифосфатов мембраны, которые переводятся фосфоинозитол-3-киназой в фосфоинозитол-3,4,5-трифосфаты. Накопление последних стабилизирует F-актин, снижая подвижность постсинаптических AMPA-рецепторов,

и способствует активации киназы Akt, которая инактивирует киназу 3В гликогенсинтазы (GSK3β), участвующую в эндоцитозе AMPA-рецепторов [12].

Локализация NMDA-рецепторов в рафтах облегчает их олигомеризацию, а удаление холестерина угнетает вход  $Ca^{2+}$  через NMDA-рецепторы, способствует их десенситизации и ингибирует долговременную потенциацию в гиппокампе [65]. Наоборот, 24-ГХ, действуя как аллостерический модулятор, в субмикромольных концентрациях потенцирует опосредуемый NMDA-рецепторами ответ, способствуя индукции долговременной потенциации в срезах гиппокампа. Интересно, что 25-ГХ (в субмикромольной концентрации) препятствует развитию данного эффекта 24-ГХ [66]. Вход  $Ca^{2+}$  через NMDA-рецепторы может вызывать как феномены синаптической пластичности, так и гибель клетки (эксайтотоксичность), что зависит от величины потока  $Ca^{2+}$  и локализации рецепторов (в рафтах или нет, в синаптическом или внесинаптическом регионе). NMDA-рецепторы рафтов взаимодействуют с кавеолином-1, что важно для активации сигнального пути Src-киназа/ERK-киназа, способствующего выживанию нейронов. Поэтому локализованные в рафтах рецепторы в меньшей степени опосредуют эксайтотоксичность. При длительном воздействии агониста и ишемии NMDA-рецепторы перемещаются в жидкую фазу мембраны [67]. Сверхактивация внесинаптических NMDA-рецепторов преимущественно вовлекается в эксайтотоксичность [12]. В липидных рафтах располагается транспортер возбуждающих аминокислот (EAAT1-4), и удаление холестерина снижает опосредуемый транспортером  $Na^{+}$ -зависимый захват глутамата в глиальные и нейрональные клетки [68], способствуя эксайтотоксичности. Интересно, что активация NMDA-рецепторов вызывает быстрое снижение внутриклеточного содержания холестерина (возможно, рециклирующего эндосом), что ведет к активации Cdc42- и Rab11-зависимого перемещения AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану. Это способствует возникновению долговременной синаптической потенциации [69].

### ХОЛЕСТЕРИН И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В последнее время увеличивается количество данных, указывающих на связь дефектов в метаболизме холестерина и синаптической передаче с развитием нейродегенеративных заболеваний [2, 11, 12]. На значимость холестерина для мозга указывает большое число редких наследственных заболеваний с выраженными неврологическими симптомами, вызванных мутациями генов, прямо или косвенно вовлеченных в метаболизм холестерина. Мы проанализировали

данные об изменении обмена холестерина при ряде патологий ЦНС, непосредственно связанных с мутациями в генах, продукты которых вовлечены в биосинтез холестерина (синдром Смита–Лемли–Опица), его внутриклеточный трафик (болезнь Нимана–Пика типа С) и регуляцию синтеза (болезнь Гентингтона).

**Синдром Смита–Лемли–Опица**

Причиной некоторых заболеваний, вызывающих нейродегенерацию и пороки развития, являются нарушения путей биосинтеза холестерина. При ластеролозах обнаруживается дефект в 3β-гидроксистероид-5-десатуразе, при десмостеролозах – в 3β-гидроксистерол-24-редуктазе, при церебротендинальном ксантоматозе – в холестерин-27-гидроксилазе. Синдром Смита–Лемли–Опица – наиболее распространенное аутосомно-рецессивное заболевание этого класса (1/20000 живорожденных), вызывается мутациями в гене *dhcr7*, кодирующем 7-дегидрохолестеролредуктазу [70]. В наиболее тяжелых случаях мутации ведут к гибели плода или младенца. Dhcr7 катализирует последний этап пути Kandutsch–Russell синтеза холестерина. В результате мутаций активность

Dhcr7 снижается, что ведет к увеличению содержания 7-дегидрохолестерина и недостатку холестерина в клетках, плазме и мозге (рис. 4). При синдроме Смита–Лемли–Опица концентрация 24-ГХ в плазме снижается, а 27-ГХ увеличивается [71]. При этом заболевании наблюдаются множественные аномалии развития мозга и органов, снижение умственных способностей, эмоциональные расстройства и проблемы со сном. У пациентов с сильно выраженными симптомами концентрация холестерина в плазме может составлять 2% от нормальных значений. При умеренных симптомах уровень холестерина в плазме может быть нормальным, однако это не может компенсировать дефицит функций мозга, что указывает на участие холестерина мозга в генезе неврологических симптомов [70]. С другой стороны, эти симптомы могут быть обусловлены накоплением субстрата Dhcr7 – 7,8-дегидродесмостерола и его окисленных метаболитов [72]. Некоторые тератогенные эффекты при синдроме Смита–Лемли–Опица вызваны, вероятно, дефектами в SHH-сигнализации, поскольку для активности белка SHH (морфогенный фактор, Sonic Hedgehog) требуется ковалентное присоединение холестерина [70].



Рис. 4. Нарушение синтеза холестерина при синдроме Смита–Лемли–Опица. Связь с синаптической дисфункцией. Подробные объяснения в тексте

При синдроме Смита–Лемли–Опица холестерин в мембранах замещается 7-дегидрохолестерином, а поскольку его свойства сходны со свойствами холестерина, в функционировании мембран наблюдаются тонкие изменения. В частности, уменьшаются жесткость мембраны и способность стабилизировать изгибы, что важно при экзо- и эндоцитозе. Также формируются дефектные рафты с нарушенным белковым составом [73]. Снижение уровня холестерина может влиять на сигнализацию, зависящую от многих рецепторов. У мутантных мышей с синдромом Смита–Лемли–Опица нарушен ответ NMDA-рецепторов на глутамат [74]. 7-Дегидрохолестерин окисляется активными формами кислорода с формированием десятков вариантов оксистеролов, некоторые из них проявляют активность в субмикромольных концентрациях [72] и потенциально могут воздействовать на экзо- и эндоцитоз [55]. 7-Дегидрохолестерин может нарушать связывание с лигандом серотониновых рецепторов 1A [75]. При синдроме Смита–Лемли–Опица в аксонах и дендритах нейронов гиппокампа, возможно, в результате изменения состояния липидных рафтов повышена активность малых GTP-аз семейства Rho [76], вовлеченных в управление динамикой актинового цитоскелета. При синдроме Смита–Лемли–Опица происходит ги-

перфосфорилирование кофилина-1, который утрачивает способность разрушать актиновые филаменты. Стабилизация цитоскелета может опосредованно воздействовать на процессы экзо- и эндоцитоза, трафик синаптических везикул/рецепторов. Все это может приводить к нарушению высвобождения различных нейромедиаторов (серотонина, дофамина) и развитию неврологических симптомов [77].

### Болезнь Нимана–Пика типа С

Прямая связь между нарушением метаболизма холестерина в мозге и нейродегенерацией ясно показана при болезни Нимана–Пика типа С, редкой аутосомно-рецессивной патологии (1/150000 новорожденных), при которой наблюдается прогрессирующая гибель нейронов и преждевременная смерть, часто развивается гепатоспленомегалия и болезни легких. При болезни Нимана–Пика типа С в головном мозге наблюдается массивная потеря клеток Пуркинье мозжечка, что согласуется с нарушением двигательного контроля [2]. Причиной заболевания являются мутации в генах *NPC1* (95% случаев) или *NPC2* (5%), которые приводят к дефициту соответствующих белков (рис. 5). При недостатке NPC1 или NPC2 в нейронах и глии холестерин и в меньшей степени другие липиды (в частности, гликолипи-

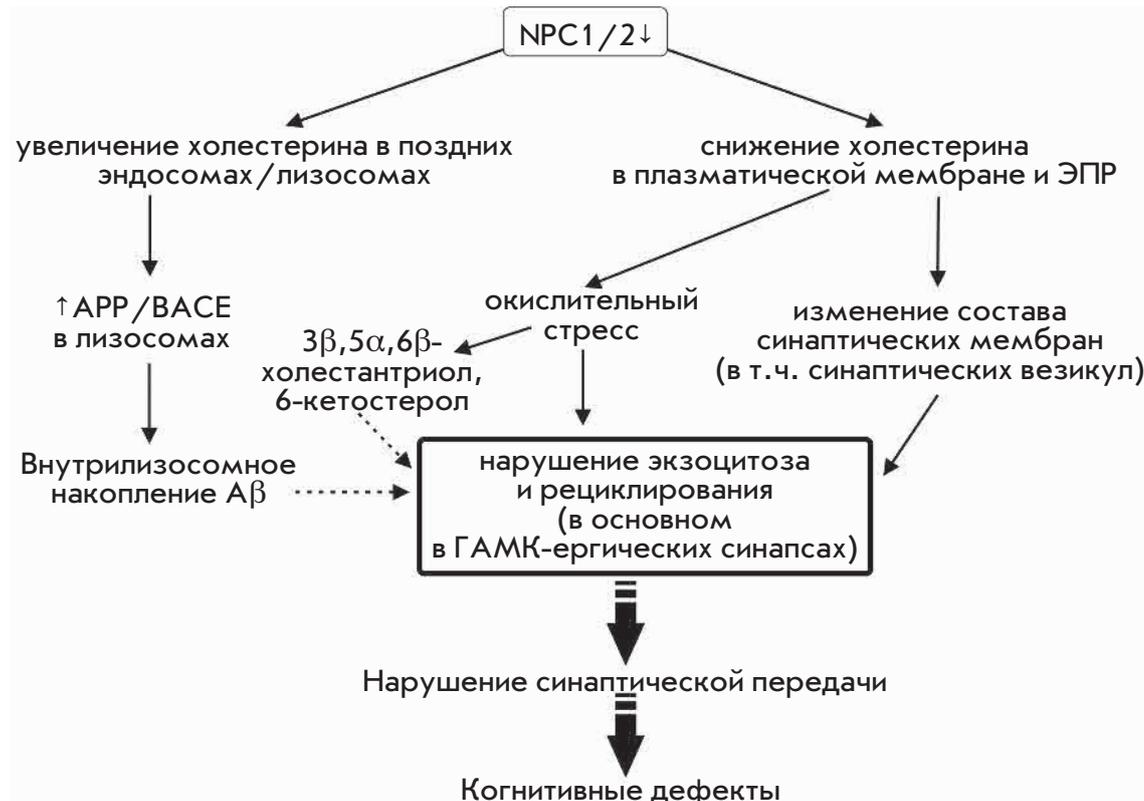


Рис. 5. Изменение обмена холестерина при болезни Нимана–Пика типа С. Влияние на синаптическую передачу. Подробные объяснения в тексте

ды) «запираются» в поздних эндосомах/лизосомах и не поступают в плазматическую мембрану и ЭПР [16]. Интересно, что при дефиците NPC1 содержание холестерина в дистальных частях аксонов резко уменьшается и повышается в телах нейронов. Возможно, неврологические дефекты при болезни Нимана–Пика типа С обусловлены снижением холестерина в аксонах, особенно в нервных окончаниях. Согласуется с этой идеей изменение состава и морфологии синаптических везикул, рециклирующих эндосом в нервном окончании при дефиците NPC1 [18]. При болезни Нимана–Пика типа С наблюдается усиленное образование ряда оксистеролов,  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -холестантриола и 6-кетостерола в мозге, вызванное окислительным стрессом [2].

При болезни Нимана–Пика типа С дегенерация сомы нейронов является конечным звеном патологического каскада. Сначала же развивается дегенерация пресинаптических нервных терминалей, здесь же в рециклирующих эндосомах локализуется поврежденный белок NPC1 [18]. По-видимому, нейродегенерация может начинаться из нервных окончаний. На ранних стадиях заболевания (до нейродегенерации и исчезновения синапсов) наблюдаются пресинаптические нарушения: угнетаются процессы вызванного экзоцитоза и доставки синаптических везикул в сайты экзоцитоза [78]. Причем нарушения экзоцитоза и замедление кругооборота синаптических везикул сильнее выражены в ГАМК-ергических нервных окончаниях, что может рождал дисбаланс возбуждающей/тормозной нейротрансмиттерной передачи [79]. Возможно, альтерации синаптической передачи являются причинами ряда симптомов болезни Нимана–Пика типа С, таких, как атаксия, катаплексия, нарушение рефлексов. Схожие изменения в экзоцитозе синаптических везикул наблюдаются при удалении мембранного холестерина высокими дозами метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) [78]. Обнаружение NPC1 в рециклирующих эндосомах в нервных окончаниях указывает на возможность участия NPC1 в медленном пути рециклирования везикул, важном для сохранения численности синаптических везикул в течение длительной синаптической активности [18].

На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения болезни Нимана–Пика типа С. Однако последние исследования дали повод надеяться на появление адекватной терапии. Однократное подкожное введение холестеринсвязывающего компонента (МЦД) животным с делецией генов *NPC1* замедляло развитие нейродегенерации и вдвое увеличивало продолжительность жизни [80]. Хотя МЦД не может эффективно проникать через ГЭБ, малые его количества все же попадают в мозг. Высокие дозы

МЦД (5–10 мМ), обычно используемые для удаления существенного количества мембранного холестерина, токсичны для нейронов и блокируют синаптическую передачу [3]. Низкие же дозы МЦД (например, 0.1 мМ) слабо влияют на мембранный холестерин [62] и могут подвергаться эндоцитозу, попадая в нейроны. Захваченные молекулы МЦД, возможно, могут освобождать «запертый» в поздних эндосомах/лизосомах холестерин и направлять его в ЭПР и плазматическую мембрану. Инъекции 2-гидроксипролил- $\beta$ -циклодекстрина в спинномозговую жидкость снижают накопление холестерина в эндо/лизосомах и улучшают выживаемость клеток Пуркиньи [16]. Недавно были разработаны соединения (полиротаксаны), которые могут расщепляться в лизосомах с освобождением  $\beta$ -циклодекстринов. Они проявляют высокую эффективность, препятствуя накоплению холестерина в лизосомах при болезни Нимана–Пика типа С [81]. Следует заметить, что те же формы циклодекстринов обладают нейропротекторной активностью в клеточных и мышечных моделях болезни Альцгеймера [82].

При болезни Нимана–Пика типа С происходит внутриклеточное накопление амилоидного пептида  $\beta$  (в нагруженных холестерином лизосомах) и фибриллярных клубков из гиперфосфорилированного белка tau. В спинномозговой жидкости при болезни Нимана–Пика типа С увеличивается концентрация амилоидных пептидов  $\beta$  из 38, 40 и 42 аминокислотных остатков. Однако амилоидные бляшки не образуются, что, вероятно, связано с ранней летальностью при этом заболевании [83]. Диффузные амилоидные бляшки могут появиться при болезни Нимана–Пика типа С у носителей аллеля ApoE4, у которых снижен клиренс амилоидного пептида  $\beta$ . Носительство аллеля ApoE4 коррелирует с более тяжелым течением и ранним началом неврологических проявлений болезни Нимана–Пика типа С [84].

### Болезнь Гентингтона

Это аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание характеризуется когнитивными и моторными нарушениями. Болезнь Гентингтона возникает в результате увеличения количества остатков глутамина (более 36 копий, полиглутаминовая экспансия) в белке гентингтин. Токсичному воздействию данного белка подвержены нейроны стриатума и коры [85]. Биосинтез холестерина снижен в мозге при болезни Гентингтона [10]. Мутантный гентингтин снижает активность фактора транскрипции SREBP, что подавляет экспрессию его генов-мишеней и ведет к уменьшению образования холестерина в нейронах коры и стриатума (рис. 6). Уровень холестерина снижается сначала в си-

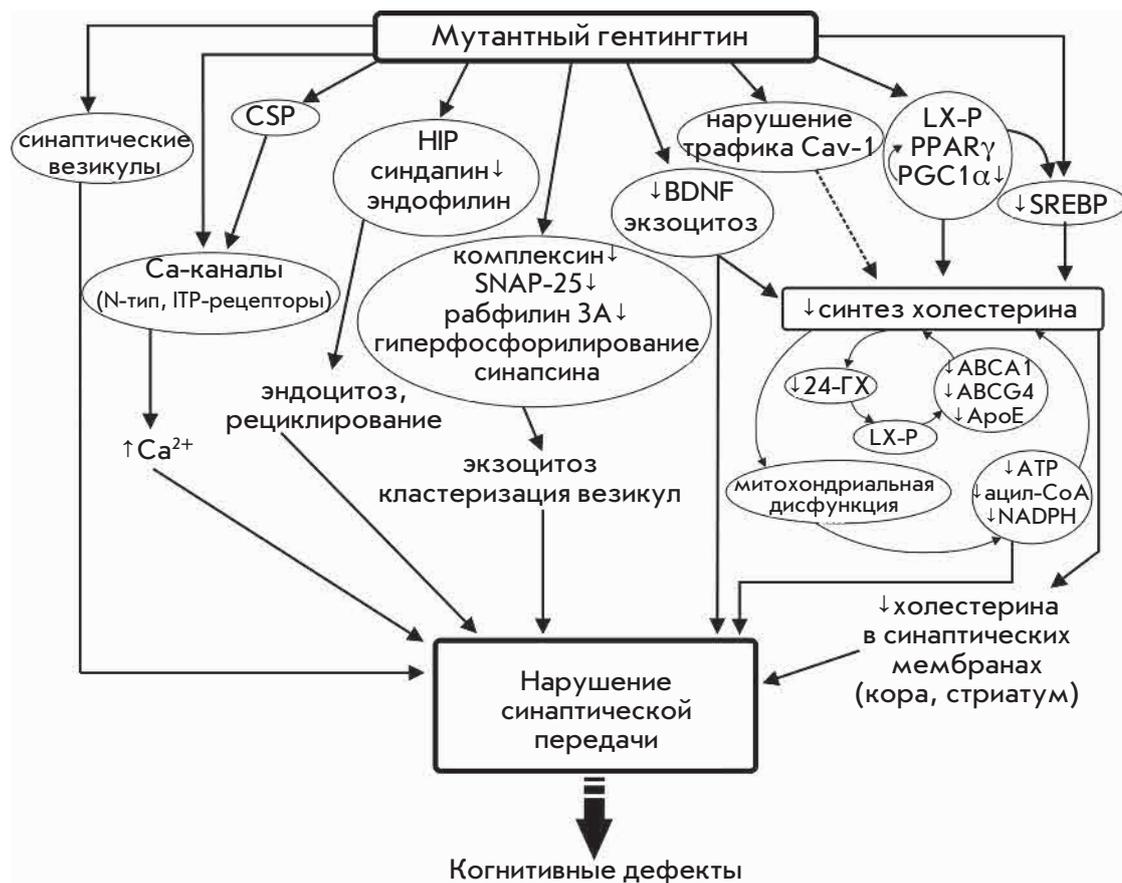


Рис. 6. Влияние мутантного белка гентинггина на синаптическую передачу и обмен холестерина. Подробные объяснения в тексте

наптосомальных мембранах, а затем в миелине. Добавление экзогенного холестерина (до 15 мкМ) к нейронам стриатума, экспрессирующим мутантный гентинггин, увеличивает их выживаемость [86]. Чем больше длина полиглутаминового участка гентинггина, тем сильнее подавлен синтез холестерина и тяжелее протекает заболевание [34]. С возрастом различие в содержании холестерина у здоровых животных и животных с болезнью Гентингтона увеличивается [86]. При болезни Гентингтона наблюдается уменьшение на 50% синтеза холестерина в фибробластах, снижение общего содержания холестерина в плазме. Причем содержание холестерина в плазме значительно уменьшено уже на бессимптомной стадии [87]. Наоборот, концентрация 24-ГХ в начале болезни Гентингтона увеличивается, а на более поздних стадиях снижается за счет прогрессирующего снижения метаболизма холестерина при атрофии стриатума [10]. Начальный всплеск 24-ГХ может отражать последнюю «попытку» организма компенсировать недостаток обмена холестерина. Дальнейшее снижение 24-ГХ в мозге может способствовать уменьшению синтеза холестерина за счет ослабления активации LX-рецепторов и экспрессии

зависимых от LX-рецептора транскриптов (ABCA1, ABCG4, ApoE). В итоге астроциты с мутантным гентинггином синтезируют и секретируют меньше ApoE, а выделяемые ApoE-частицы меньше по размеру и содержат меньше липидов, поэтому менее эффективно доставляют холестерин от астроцитов к нейронам и менее эффективно удаляют избыток холестерина [86]. Агонисты LX-рецепторов могут частично подавлять симптомы болезни Гентингтона [10]. В условиях сниженной продукции холестерина в мембранах и лизосомах/эндосомах могут образовываться скопления холестерина и его эфиров за счет снижения интенсивности удаления холестерина в составе ApoE-частиц и 24-ГХ. Появление скоплений холестерина может быть связано с нарушением транспорта caveолина-1 под влиянием мутантного гентинггина [88]. BDNF, освобождаемый из нервных окончаний кортикальных нейронов в стриатуме, вовлечен не только в синаптическую пластичность и контроль выживаемости, но и стимулирует синтез холестерина в постсинаптических нейронах. Мутантный гентинггин угнетает продукцию холестерина, воздействуя на транспорт и освобождение BDNF [10].

Белок гентингтин дикого типа может связываться с рядом ядерных рецепторов, вовлеченных в липидный метаболизм, например, LX-рецептор, PPAR $\gamma$  (peroxisome-proliferator-activated receptor gamma), рецептор витамина D [10]. Сверхэкспрессия гентингина активирует LX-рецептор, тогда как при его отсутствии наблюдается ингибирование транскрипции, опосредуемой LX-рецептором. Возможно, мутантный гентингтин в меньшей степени может стимулировать LX-рецептор и экспрессию его генов-мишеней, в том числе SREBP. В олигодендроцитах мутантный гентингтин подавляет эффект коактиватора 1 PPAR $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ ) на экспрессию ферментов синтеза и метаболизма холестерина, белков миелина, нарушая образование миелиновой оболочки [89]. Еще на бессимптомной стадии при болезни Гентингтона снижена экспрессия PGC1 $\alpha$  в средних шипиковых нейронах стриатума. Это может быть одной из причин выраженной митохондриальной дисфункции, так как PGC1 $\alpha$  вовлечен в биогенез митохондрий и окислительный метаболизм, регулирует экспрессию компонентов электронно-транспортной цепи [90]. Нарушение функционирования митохондрий может вести к недостатку АТФ, NADPH и субстратов, необходимых для синтеза холестерина. При болезни Гентингтона значительно возрастает текучесть митохондриальной мембраны, что может быть опосредовано нарушением синтеза холестерина. Холестерин-подобная молекула, олесоксим, способная проникать в клетку и накапливаться в мембране митохондрий, проявляет терапевтическую эффективность при коррекции митохондриальной дисфункции в моделях амиотрофического бокового склероза, периферической нейропатии и болезни Гентингтона. В последнем случае олесоксим понижает текучесть

мембран митохондрий, а при хроническом применении повышает в них содержание холестерина [91].

Перед клинической манифестацией болезни Гентингтона нарушаются процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул (рис. 6). Сам гентингтин концентрируется в пресинапсе и связывается с синаптическими везикулами. У мышей с мутантным гентингином наблюдается аномальное фосфорилирование синапсина I и прогрессирующее снижение концентрации комплекса II, SNAP-25, рабфилина 3A в нервных окончаниях специфических участков коры [92]. В итоге угнетается экзоцитоз и уменьшается размер пула синаптических везикул. Уровень цитоплазматического Ca<sup>2+</sup> в терминалях повышается, возможно, в результате ослабления ингибиторного влияния со стороны CSP (cysteine-string protein) или непосредственно гентингина на кальциевые каналы N-типа или ИТР-рецепторы соответственно [93]. Некоторые белки, участвующие в эндоцитозе, специфично связываются с гентингином, – это HIP1 (huntingtin interacting protein 1), HIP1R, синдапин I, эндофилин. При болезни Гентингтона из пресинаптических регионов пропадает эндоцитозный каркасный белок – синдапин, а HIP1 перестает должным образом функционировать, что приводит к сильному нарушению эндоцитоза. Кроме того, при болезни Гентингтона страдает связанная с эндосомами и зависящая от Rab11 рециклизация синаптических везикул, что ведет к появлению аномально маленьких синаптических везикул и угнетению синаптической передачи [94]. ●

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dietschy J.M. // Biol. Chem. 2009. V. 390. № 4. P. 287–293.
- Vance J.E. // Disease Models Mechanisms. 2012. V. 5. P. 746–755.
- Петров А.М., Зефирова А.Л. // Успехи физиологических наук. 2013. Т. 44. № 1. С. 17–38.
- Saeed A.A., Genové G., Li T., Lütjohann D., Olin M., Mast N., Pikuleva I.A., Crick P., Wang Y., Griffiths W. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 34. P. 23712–23722.
- Elahy M., Jackaman C., Mamo J.C.L., Lam V., Dhaliwal S.S., Giles C., Nelson D., Takechi R. // Immunity Ageing. 2015. V. 12. A. 2.
- Sagare A.P., Bell R.D., Zhao Z., Ma Q., Winkler E.A., Ramathan A., Zlokovic B.V. // Nat. Commun. 2013. V. 4. A. 2932.
- Russell D.W., Halford R.W., Ramirez D.M., Shah R., Kotti T. // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 1017–1040.
- Safer G., Brügger B., Lappe-Siefke C., Möbius W., Tozawa R., Wehr M.C., Wieland F., Ishibashi S., Nave K.A. // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. № 4. P. 468–475.
- Numakawa T., Suzuki S., Kumamaru E., Adachi N., Richards M., Kunugi H. // Histol. Histopathol. 2010. V. 25. № 2. P. 237–258.
- Leoni V., Caccia C. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. pii: S1388-1981(15)00003-7.
- Anchisi L., Dessi S., Pani A., Mandas A. // Front. Physiol. 2013. V. 3. P. 1–12.
- Martin M.G., Ahmed T., Korovaichuk A., Venero C., Menchón S.A., Salas I., Munck S., Herreras O., Balschun D., Dotti C.G. // EMBO Mol. Med. 2014. V. 6. № 7. P. 902–917.
- Suzuki R., Ferris H.A., Chee M.J., Maratos-Flier E., Kahn C.R. // PLoS Biol. 2013. V. 11. № 4. P. e1001532.
- Camargo N., Brouwers J.F., Loos M., Gutmann D.H., Smit A.B., Verheijen M.H. // FASEB J. 2012. V. 26. № 10. P. 4302–4315.
- Verheijen M.H., Camargo N., Verdier V., Nadra K., de Preux Charles A.S., Médard J.J., Luoma A., Crowther M., Inouye H., Shimano H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 50. P. 21383–21388.

16. Peake K.B., Vance J.E. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 9290–9298.
17. Bryleva E.Y., Rogers M.A., Chang C.C., Buen F., Harris B.T., Rousselet E., Seidah N.G., Oddo S., LaFerla F.M., Spencer T.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 3081–3086.
18. Karten B., Campenot R.B., Vance D.E., Vance J.E. // *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. P. 504–514.
19. Bu G. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 5. P. 333–344.
20. Hayashi H. // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34. № 4. P. 453–461.
21. Lane-Donovan C., Philips G.T., Herz J. // *Neuron.* 2014. V. 83. № 4. P. 771–787.
22. Vaughan A.M., Oram J.F. // *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 11. P. 2433–2443.
23. Karasinska J.M., de Haan W., Franciosi S., Ruddle P., Fan J., Kruit J.K., Stukas S., Lütjohann D., Gutmann D.H., Wellington C.L. // *Neurobiol. Dis.* 2013. V. 54. P. 445–455.
24. Rushworth J.V., Griffiths H.H., Watt N.T., Hooper N.M. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 13. P. 8935–8951.
25. Liu Q., Trotter J., Zhang J., Peters M.M., Cheng H., Bao J., Han X., Weeber E.J., Bu G. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 50. P. 17068–17078.
26. Rensen P.C., Jong M.C., van Vark L.C., van der Boom H., Hendriks W.L., van Berkel T.J., Biessen E.A., Havekes L.M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 12. P. 8564–8571.
27. Vance J.E., Karten B. // *J. Lipid Res.* 2014. V. 55. № 8. P. 1609–1621.
28. Ignatius M.J., Gebicke-Härter P.J., Skene J.H., Schilling J.W., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Shooter E.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 1125–1129.
29. Gosselet F., Saint-Pol J., Fenart L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 446. № 3. P. 687–691.
30. Hudry E., Van Dam D., Kulik W., De Deyn P.P., Stet F.S., Ahouansou O., Benraiss A., Delacourte A., Bougnères P., Aubourg P. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 1. P. 44–53.
31. Sodero A.O., Vriens J., Ghosh D., Stegner D., Brachet A., Pallotto M., Sassoè-Pognetto M., Brouwers J.F., Helms J.B., Nieswandt B. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 7. P. 1764–1773.
32. Sodero A.O., Weissmann C., Ledesma M.D., Dotti C.G. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 6. P. 1043–1053.
33. Marwarha G., Ghribi O. // *Exp. Gerontol.* 2014. pii: S0531-5565(14)00270-8.
34. Brown A.J., Jessup W. // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 3. P. 111–122.
35. Heverin M., Bogdanovic N., Lütjohann D., Bayer T., Pikuleva I., Bretilon L., Diczfalusy U., Winblad B., Björkhem I. // *J. Lipid Res.* 2004. V. 45. № 1. P. 186–193.
36. Lathe R., Saponova A., Kotelevtsev Y. // *BMC Geriatrics.* 2014. V. 14. A. 36
37. Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2012. V. 42. № 2. P. 144–152.
38. Jennemann R., Sandhoff R., Wang S., Kiss E., Gretz N., Zuliani C., Martin-Villalba A., Jäger R., Schorle H., Kenzelmann M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 35. P. 12459–12464.
39. Suzuki T., Zhang J., Miyazawa S., Liu Q., Farzan M.R., Yao W.D. // *J. Neurochem.* 2011. V. 119. № 1. P. 64–77.
40. Stary C.M., Tsutsumi Y.M., Patel P.M., Head B.P., Patel H.H., Roth D.M. // *Front. Physiol.* 2012. V. 3. P. 393.
41. Head B.P., Peart J.N., Panneerselvam M., Yokoyama T., Pearn M.L., Niesman I.R., Bonds J.A., Schilling J.M., Miyanohara A., Headrick J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. P. e15697.
42. Fantini J., Yahi N. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. V. 991. P. 15–26.
43. Uversky V.N. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015. V. 855. P. 33–66.
44. Rushworth J.V., Hooper N.M. // *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011. P. 603052.
45. Petrov A.M., Kudryashova K.E., Odnoshivkina Yu.G., Zefirov A.L. // *Neurochem. J.* 2011. V. 5. № 1. P. 13–19.
46. Matsuzaki K. // *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011. V. 2011. P. 956104.
47. Martins I.C., Kuperstein I., Wilkinson H., Maes E., Vanbrabant M., Jonckheere W., van Gelder P., Hartmann D., D’Hooge R., De Strooper B. // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 1. P. 224–233.
48. Tong J., Borbat P.P., Freed J.H., Shin Y.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 13. P. 5141–5146.
49. Rohrbough J., Broadie K. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. V. 6. № 2. P. 139–150.
50. Jia J.Y., Lamer S., Schümann M., Schmidt M.R., Krause E., Hauke V. // *Mol. Cell Proteomics.* 2006. V. 5. № 11. P. 2060–2071.
51. Sieber J.J., Willig K.I., Heintzmann R., Hell S.W., Lang T. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. № 8. P. 2843–2851.
52. Taverna E., Saba E., Linetti A., Longhi R., Jeromin A., Righi M., Clementi F., Rosa P. // *J. Neurochem.* 2007. V. 100. № 3. P. 664–677.
53. Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1851. № 5. P. 674–685.
54. Petrov A.M., Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Tarakanova O.I., Zefirov A.L. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2010. V. 40. № 8. P. 894–901.
55. Petrov A.M., Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2014. V. 44. № 9. P. 1020–1030.
56. Zamir O., Charlton M.P. // *J. Physiol.* 2006. V. 571. № 1. P. 83–99.
57. Tarakanova O.I., Petrov A.M., Zefirov A.L. // *Doclady Biol. Sci.* 2011. V. 438. P. 138–140.
58. Petrov A.M., Yakovleva A.A., Zefirov A.L. // *J. Physiol.* 2014. V. 592. № 22. P. 4995–5009.
59. Smith A.J., Sugita S., Charlton M.P. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 17. P. 6116–6121.
60. Petrov A.M., Zakyrjanova G.F., Yakovleva A.A., Zefirov A.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 456. № 1. P. 145–150.
61. Tarasenko A.S., Sivko R.V., Krisanova N.V., Himmelreich N.H., Borisova T.A. // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 41. № 3. P. 358–367.
62. Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., Giniatullin A.R., Urazaev A.K., Zefirov A.L. // *Neuroscience.* 2011. V. 186. P. 1–12.
63. Hering H., Lin C.C., Sheng M. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 8. P. 3262–3271.
64. Hou Q., Huang Y., Amato S., Snyder S.H., Haganir R.L., Man H.Y. // *Mol. Cell Neurosci.* 2008. V. 38. № 2. P. 213–223.
65. Korinek M., Vyklicky V., Borovska J., Lichnerova K., Kania-kova M., Krausova B., Krusek J., Balik A., Smejkalova T., Horak M. // *J. Physiol.* 2015. V. 593. № 10. P. 2279–2293.
66. Paul S.M., Doherty J.J., Robichaud A.J., Belfort G.M., Chow B.Y., Hammond R.S., Crawford D.C., Linsenhardt A.J., Shu H.J., Izumi Y. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 44. P. 17290–17300.
67. Head B.P., Patel H.H., Tsutsumi Y.M., Hu Y., Mejia T., Mora R.C., Insel P.A., Roth D.M., Drummond J.C., Patel P.M. // *FASEB J.* 2008. V. 22. № 3. P. 828–840.
68. Butchbach M.E., Tian G., Guo H., Lin C.L. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 33. P. 34388–34396.
69. Brachet A., Norwood S., Brouwers J.F., Palomer E., Helms J.B., Dotti C.G., Esteban J.A. // *J. Cell Biol.* 2015. V. 208. № 6. P. 791–806.
70. Nowaczyk M.J., Irons M.B. // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2012. V. 160C. № 4. P. 250–262.
71. Björkhem I., Starck L., Andersson U., Lütjohann D., von Bahr S., Pikuleva I., Babiker A., Diczfalusy U. // *J. Lipid Res.* 2001. V. 42. № 3. P. 366–371.

72. Korade Z., Xu L., Shelton R., Porter N.A. // *J. Lipid Res.* 2010. V. 51. № 11. P. 3259–3269.
73. Staneva G., Chachaty C., Wolf C., Quinn P.J. // *J. Lipid Res.* 2010. V. 51. № 7. P. 1810–1822.
74. Wassif C.A., Zhu P., Kratz L., Krakowiak P.A., Battaile K.P., Weight F.F., Grinberg A., Steiner R.D., Nwokoro N.A., Kelley R.I. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 6. P. 555–564.
75. Singh P., Paila Y.D., Chattopadhyay A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 358. № 2. P. 495–499.
76. Jiang X.S., Wassif C.A., Backlund P.S., Song L., Holtzclaw L.A., Li Z., Yergey A.L., Porter F.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 7. P. 1347–1357.
77. Sparks S.E., Wassif C.A., Goodwin H., Conley S.K., Lanham D.C., Kratz L.E., Hyland K., Gropman A., Tierney E., Porter F.D. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014. V. 37. № 3. P. 415–420.
78. Hawes C.M., Wiemer H., Krueger S.R., Karten B. // *J. Neurochem.* 2010. V. 114. P. 311–322.
79. Xu S., Zhou S., Xia D., Xia J., Chen G., Duan S., Luo J. // *Neuroscience.* 2010. V. 167. P. 608–620.
80. Liu B., Turley S.D., Burns D.K., Miller A.M., Repa J.J., Dietschy J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 2377–2382.
81. Tamura A., Yui N. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 15. P. 9442–9454.
82. Malnar M., Hecimovic S., Mattsson N., Zetterberg H. // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 72 Pt A. P. 37–47.
83. Yamazaki T., Chang T.Y., Haass C., Ihara Y. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 6. P. 4454–4460.
84. Fu R., Yanjanin N.M., Elrick M.J., Ware C., Lieberman A.P., Porter F.D. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2012. V. 158A. № 11. P. 2775–2780.
85. Margulis B.A., Vigont V., Lazarev V.F., Kaznacheyeva E.V., Guzhova I.V. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. № 13. P. 1997–2007.
86. Valenza M., Leoni V., Karasinska J.M., Petricca L., Fan J., Carroll J., Pouladi M.A., Fossale E., Nguyen H.P., Riess O. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. P. 10844–10850.
87. Wang R., Ross C.A., Cai H., Cong W.N., Daimon C.M., Carlson O.D., Egan J.M., Siddiqui S., Maudsley S., Martin B. // *Front. Physiol.* 2014. V. 5. P. 231.
88. Trushina E., Canaria C.A., Lee D.Y., McMurray C.T. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 1. P. 129–144.
89. Xiang Z., Valenza M., Cui L., Leoni V., Jeong H.K., Brilli E., Zhang J., Peng Q., Duan W., Reeves S.A. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 26. P. 9544–9553.
90. Tsunemi T., La Spada A.R. // *Prog. Neurobiol.* 2012. V. 97. № 2. P. 142–151.
91. Eckmann J., Clemens L.E., Eckert S.H., Hagl S., Yu-Taeger L., Bordet T., Pruss R.M., Muller W.E., Leuner K., Nguyen H.P. // *Mol. Neurobiol.* 2014. V. 50. № 1. P. 107–118.
92. Smith R., Klein P., Koc-Schmitz Y., Waldvogel H.J., Faull R.L., Brundin P., Plomann M., Li J.Y. // *J. Neurochem.* 2007. V. 103. № 1. P. 115–123.
93. Bezprozvanny I.B. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 1(4). P. 72–80.
94. Steinert J.R., Campesan S., Richards P., Kyriacou C.P., Forsythe I.D., Giorgini F. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 13. P. 2912–2922.

УДК 578.825.11

# Антигерпесвирусная эффективность фосфита ациклогуанозина, преодолевающего барьер резистентности к ацикловиру

В. Л. Андропова<sup>1\*</sup>, М. В. Ясько<sup>2</sup>, М. К. Куханова<sup>2</sup>, Г. А. Галегов<sup>2</sup>, Ю. С. Скоблов<sup>3</sup>, С. Н. Кочетков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.08.2015

Принята к печати 04.11.2015

**РЕФЕРАТ** Фосфит ациклогуанозина, как показано ранее, одинаково эффективен в отношении как чувствительных, так и резистентных к ацикловиру штаммов вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) в культуре клеток. На модели герпетического энцефалита, развивающегося у мышей при интраперитонеальном введении ВПГ-1, внутрибрюшинное введение фосфита ациклогуанозина эффективно защищало животных от гибели. В представленной работе продолжено изучение антигерпесвирусной эффективности фосфита ациклогуанозина *in vivo*, вводимого неинвазивными способами – перорально и в виде мазевых накожных аппликаций. Показано, что фосфит ациклогуанозина, вводимый мышам перорально 2 раза в день в течение 5 дней, эффективно предотвращал развитие системной герпетической инфекции. Смертность мышей в контрольной группе составляла 57%. Использование фосфита ациклогуанозина в дозах 600, 800 и 1000 мг/кг в день значительно увеличивало выживаемость и среднюю продолжительность жизни животных по сравнению с животными контрольной группы, получавшими плацебо. На модели экспериментальной герпетической кожной инфекции морских свинок сравнили показатели эффективности мазевой лекарственной формы фосфита ациклогуанозина и ацикловира на основе полиэтиленгликоля после 5-дневного курса. Установлено, что фосфит ациклогуанозина оказывает лечебное действие, которое выражается в статистически значимом сокращении площади пораженной поверхности и уменьшении количества везикулярных образований. Мазь фосфита ациклогуанозина 10% проявляет терапевтический эффект, хорошо сопоставимый с эффектом 5% мази ациклогуанозина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антивирусная активность, вирус простого герпеса, *in vitro*, *in vivo*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВПГ-1 и ВПГ-2 – вирус простого герпеса первого и второго типа; ТК – тимидинкиназа; АЦВ/АЦГ – ацикловир/ациклогуанозин; Ф-АЦГ – фосфит ациклогуанозина; ПЦВ – пенцикловир; ПЭГ-600 – полиэтиленгликоль 600; СПЖ – средняя продолжительность жизни; ФМК – фосфономуравьиная кислота; ЦДВ – цидофовир; ЦД<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая концентрация; ИД<sub>50</sub> и ИД<sub>95</sub> – 50% и 95% ингибирующие дозы; ХТИ – химиотерапевтический индекс; в/б – внутрибрюшинно; ЦПЭ – цитопатический эффект.

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые вирусом простого герпеса (ВПГ), чрезвычайно широко распространены: от 50 до 95% взрослого населения Земли имеют антитела к ВПГ-1, а 20–30% людей к 15–29 годам являются носителями ВПГ-2, и с возрастом количество серопозитивных лиц увеличивается [1, 2]. После первич-

ного инфицирования вирусы герпеса устанавливают пожизненную латентную инфекцию с периодически развивающимися рецидивами. Способность ВПГ поражать различные органы и ткани приводит к чрезвычайно широкому многообразию клинических проявлений инфекции – от поражений кожи, слизистых, глаз до генерализованных форм с поражением

внутренних органов и ЦНС [3]. Поэтому для лечения герпетических инфекций различной тяжести и локализации важно иметь лекарственные формы как для наружного использования, так и для системного введения. С этой целью в медицинской практике широко применяют аналоги нуклеозидов. Это прежде всего известный противогерпетический агент АЦВ (АЦГ, зовиракс, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин), выпускаемый как в виде 5% мази, 5% крема, 3% глазной мази, так и в форме таблеток, суспензии для приема внутрь 8%, лиофилизированного порошка для приготовления инфузионного раствора, лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций (группа компаний GlaxoSmithKline и др.). Кроме того, к противогерпетическим препаратам первого ряда относятся пенцикловир (ПЦВ, 1% крем) и метаболитические предшественники АЦВ и ПЦВ – валиновый эфир АЦВ (Валтрекс, таблетки в дозировке 250, 500 и 1000 мг) и фамцикловир (Фамвир, таблетки, покрытые оболочкой, 125, 250, 500 мг).

Однако к этим препаратам у вирусов герпеса развивается резистентность. Частота выделения ВПГ с лекарственной устойчивостью в клинической практике зависит от иммунного статуса пациентов и колеблется от 0.5% у иммунокомпетентных пациентов до 2–36% у иммунокомпромированных больных [4, 5]. Описаны случаи, когда с устойчивыми к АЦВ вариантами ВПГ были ассоциированы заболевания с тяжелым клиническим течением (герпетическая пневмония, менингоэнцефалит, обширные кожно-слизистые поражения и др.), которые могут приводить к смерти больного [6–9].

Резистентность ВПГ к АЦВ обуславливается мутациями в генах ТК (*UL23*) и/или *pol*-гене (*UL30*), с которыми связан механизм действия препарата. Первый этап фосфорилирования АЦВ с образованием монофосфата катализируется вирусной ТК, два следующих – клеточными ферментами. АЦВ-трифосфат (активный метаболит АЦВ) ингибирует вирусную ДНК-полимеразу, а кроме того, включается в синтезирующуюся цепочку ДНК и ингибирует элонгацию по терминационному механизму [10]. Резистентность клинических изолятов ВПГ к АЦВ в 95% случаев обусловлена мутациями в гене *UL23*, которые приводят, как правило, к потере или существенному снижению активности ТК (96%). Гораздо реже выделяют мутанты с измененной субстратной специфичностью ТК (4% от общего количества мутантов ТК) [6, 11].

Важно подчеркнуть, что из-за сходства механизмов действия АЦВ и ПЦВ резистентность ВПГ к ним носит в большинстве случаев перекрестный характер, что приводит к снижению эффективности

терапии, проводимой с использованием АЦВ, ПЦВ или их метаболитических предшественников. В международной практике в таких случаях используют три-натриевую соль фосфономуравьиной кислоты (ФМК, фоскарнет) [12, 13]. Кроме того, есть положительный опыт применения в особо тяжелых случаях ЦДВ (цидофовир, вистид), когда ФМК также оказывался неэффективным [14]. Эти препараты в большинстве случаев одинаково эффективно подавляют репродукцию как чувствительных, так и резистентных к АЦВ и ПЦВ вариантов ВПГ. К сожалению, ФМК и ЦДВ высокотоксичны и в России их использование не разрешено. Описаны также мутанты ВПГ, перекрестно резистентные к АЦВ/ПЦВ и ФМК и/или ЦДВ [15–17]. Поэтому разработка средств, эффективных против ВПГ, а также предотвращающих рецидивы этого заболевания, весьма актуальна.

Фосфит адиклогуанозина (Ф-АЦГ, Нр-АСV, фосфонат 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанина) представляет собой Н-фосфонатное производное АЦВ. Ранее на модели ВПГ-1 мы показали, что Ф-АЦГ проявляет противовирусную активность как *in vitro* (в клеточной культуре Vero E6), так и *in vivo* (при в/б введении инфицированным мышам). Было установлено, что этот препарат активен не только против эталонного штамма ВПГ-1/L<sub>2</sub>, но также сохраняет активность в отношении лабораторного АЦВ-резистентного штамма ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R и АЦВ-резистентных клинических изолятов ВПГ-1 (Avd и Sha), имеющих эпидемическое значение [18–21]. Таким образом, Ф-АЦГ может представлять интерес для практической медицины в качестве препарата, эффективно подавляющего инфекцию, вызванную как чувствительным, так и резистентными к АЦВ вариантами ВПГ-1.

В представленной работе определена эффективность вводимого перорально Ф-АЦГ при генерализованной герпетической инфекции у мышей, а также проведено сравнительное изучение мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ и АЦВ с целью разработки препарата для лечения кожных форм герпетической инфекции.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Препараты

Ф-АЦГ синтезирован в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. В качестве референс-препарата использовали АЦВ (9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин) производства GlaxoSmithKline (США/Великобритания).

### Вирусы и клетки

В работе использовали ВПГ-1 штамм L<sub>2</sub>, полученный из Государственной коллекции Института вирусологии

логии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ. Культура клеток почек зеленой мартышки Vero E6 любезно предоставлена А.М. Бутенко (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ).

### Животные

Морские свинки породы Агути весом 250 г (самцы) и белые линейные мыши BALB/c весом 8–9 г (самцы) получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России Филиал «Столбовая» (Московская обл., Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977».

### Цитотоксичность

Цитотоксичность оценивали в соответствии с общепринятым методом окрашивания клеток трипановым голубым [20, 21]. За величину ЦД<sub>50</sub> принимали концентрацию вещества, которая обеспечивает гибель 50% клеток при инкубации в течение 72 ч.

### Противовирусная активность

Противовирусную активность соединений *in vitro* оценивали микрометодом по способности защищать инфицированные клетки от гибели, предотвращая развитие вирусиндуцированного ЦПЭ, в соответствии с методом De Clercq E. и соавт. [22], как описано нами ранее [20, 21]. Монослойную культуру клеток Vero E6, выращенную в пластиковых 96-луночных планшетах (Linbro, Flow laboratories, Великобритания), инфицировали с множественностью 0.1 БОЕ/кл; продолжительность инкубации составляла 48 ч при 37°C, при этом в контроле вируса развивался 95–100% ЦПЭ, т.е. ЦПЭ охватывал весь монослой клеток. Эффективность препарата количественно выражали как ИД<sub>50</sub> и ИД<sub>95</sub> – концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного ЦПЭ на 50% и практически полностью.

### Противогерпесвирусная активность

Противогерпесвирусную активности соединений изучали на модели экспериментальной генерализованной инфекции мышей. Использовали адаптированный к мозгу мышей ВПГ-1/L<sub>2</sub>. Инфекционный материал вводили в/б в объеме 200 мкл в дозе, обеспечивающей гибель 95 или 50% животных в контрольной инфицированной нелеченной группе. Заражающая доза указана для каждого эксперимента отдельно. Животные получали тестируемые соединения, растворенные в трижды дистиллированной воде или в физиологическом растворе, в/б

или перорально в объеме 0.2 мл. Разовые дозы препаратов и количество животных в группе указаны отдельно для каждого эксперимента. Соединения вводили дважды в день в течение 5 дней, первый раз через 1 ч после заражения. Срок наблюдения – 21 сутки. Эффективность препаратов оценивали по их способности защищать животных от гибели (процент выживаемости относительно контрольной инфицированной, но нелеченной группы) и по увеличению СПЖ. За максимальную СПЖ принимали 21 день (срок наблюдения).

Через 96 ч после заражения, когда в мозге зараженных животных инфекционный титр достигал максимальных значений, забивали по три мыши из каждой группы. Извлекали головной мозг и легкие и разрушали их в гомогенизаторе Даунса при температуре 4°C. Готовили 10% суспензию в физиологическом растворе, центрифугировали ее при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли методом бляшкообразования путем титрования в культуре клеток как описано ниже. Эффективность препарата оценивали по снижению величины инфекционного титра вируса в органном материале от животных опытной группы, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой животных (инфицированных, но не леченных).

Для оценки эффективности препаратов при экспериментальной кожной инфекции [23] на скарифицированные после депиляции участки кожи морских свинок площадью около 5 см<sup>2</sup> наносили вирусный материал с последующим его втиранием. Титр вируса составлял 7.87 lg БОЕ/мл.

Через 48 ч после инокуляции ВПГ на инфицированной поверхности появлялось легкое покраснение, после чего начинали лечение путем аппликации мази 2 раза в день в течение 5 дней. В качестве основы при приготовлении мазей использовали ПЭГ-600.

### Инфекционный титр вируса

Величину инфекционного титра вируса в везикулярной жидкости определяли методом бляшкообразования, описанным ниже. Забор везикулярной жидкости проводили через 4 суток после инфицирования. Инфекционный титр вируса определяли методом бляшкообразования. 24-часовую культуру клеток, выращенную в 24-луночных пластиковых планшетах (Costar, США), заражали 10-кратными разведениями вируса. Через 1 ч клеточный монослой отмывали от неадсорбированного вируса физиологическим раствором, вносили среду покрытия (по 2 мл/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среда покрытия состояла из сред Игла и 199 (производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов

им. М.П. Чумакова РАМН, Москва), соединенных в соотношении 1 : 1, 5% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Москва), 0.4% агарозы (Sigma, США). Через 48 ч среду покрытия удаляли, инфицированные культуры фиксировали 10% нейтральным формалином, окрашивали 0.5% раствором генцианвиолета и подсчитывали число бляшек [24].

Инфекционный титр «Т» вычисляли по формуле:

$$T = \frac{\text{Число бляшек в лунке} \times \text{Кратность разведения}}{\text{Объем вносимого инокулюма}}$$

и выражали в lg БОЕ/мл, где БОЕ – бляшкообразующая единица.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что Ф-АЦГ одинаково эффективно селективно ингибирует репродукцию как чувствительного, так и резистентных к АЦВ штаммов ВПГ, включая лабораторный штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R и клинические изоляты Avd и Sha, которые циркулируют в человеческой популяции в настоящее время, относящиеся к наиболее часто встречающемуся в клинической практике ТК-негативному/дефицитному фенотипу [18, 19]. Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Результаты, полученные *in vitro*, подтверждены в опытах *in vivo* на модели экспериментальной герпетической инфекции у белых мышей BALB/c. Так как инфекция, вызываемая вариантом ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, резистентным к АЦВ, не была летальной, то об эффективности Ф-АЦГ при в/б введении судили по его влиянию на накопление вируса в головном мозге животных. Показано, что при введе-

нии Ф-АЦГ (450 мг/кг, 2 раза в день) титр вируса на 4-й день снижался на 1.30 lg БОЕ/мл (с 3.31 ± 0.16 до 2.01 ± 0.11). Этот результат был сходен с эффектом Ф-АЦГ в аналогичных условиях на модели эталонного штамма ВПГ-1: титр вируса снижался с 5.49 ± 0.25 до 4.01 ± 0.16 lg (летальность в контроле в последнем случае составляла 92.5%; в опытной группе смертность снизилась до 67.5%, СПЖ увеличилась с 4.90 ± 0.75 до 10.25 ± 1.20) [18].

Нами установлен механизм формирования резистентности штаммов ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, Avd и Sha. Штаммы ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R и Sha содержат мутации в гене UL23, которые приводят к замене R220H в ТК и, как следствие, к потере активности фермента. Такой фермент не способен катализировать первый этап фосфорилирования АЦВ, необходимый для его превращения в активный метаболит АЦВ-трифосфат, способный встраиваться в синтезирующуюся цепь вирусной ДНК и останавливать ее элонгацию по терминационному механизму. В гене UL23 штамма Avd обнаружена делеция deltaT66, расположенная в непосредственной близости от АТР-связывающего сайта фермента (аминокислотные остатки 51–63), которая может обуславливать снижение эффективности фосфорилирования АЦВ [20, 25]. Полученные результаты подтверждают принадлежность всех включенных в исследование АЦВ-резистентных штаммов ВПГ к ТК-дефицитному фенотипу и позволяют предположить, что мутации в области связывания нуклеозидов и АТР-связывающего центра не влияют существенно на метаболические превращения Ф-АЦГ с образованием монофосфата АЦВ, который, подобно АЦВ, превращается далее в ди- и трифосфат АЦВ. Однако это превращение проис-

Таблица 1. Противовирусная активность Ф-АЦГ и АЦВ в культуре клеток Vero E6 [18, 19]

Соединение	Показатель	ВПГ-1/L <sub>2</sub>	ВПГ-1/L <sub>2</sub> /R	Avd	Sha
АЦВ	ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	0.39	> 400	3.9	12.5
	ИД <sub>95</sub> , мкг/мл	1.56	> 400	31.25	50
	ХТИ	> 1026	> 1	> 102	> 32
Ф-АЦГ	ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	15.6	31.25	31.25	31.25
	ИД <sub>95</sub> , мкг/мл	31.25	62.5	250	62.5
	ХТИ	> 64	> 32	> 32	> 32

Примечание. ВПГ-1/L<sub>2</sub> – эталонный штамм вируса; ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R – лабораторный штамм вируса, глубоко резистентный к АЦВ; Avd и Sha – резистентные к АЦВ клинические изоляты ВПГ-1. Множественность инфицирования – 0.1 БОЕ/кл. Продолжительность инкубации 48 ч. Приведены результаты двух независимых опытов. ЦД<sub>50</sub> АЦВ и Ф-АЦГ равны > 400 и > 1000 мкг/мл соответственно. ХТИ вычисляли как отношение ЦД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>.

ходит, по всей вероятности, альтернативным путем, минуя стадию деградации Ф-АЦГ до АЦВ [21].

Известно, что причиной гибели животных в условиях генерализованной герпетической инфекции является развитие герпетического энцефалита, и для проявления противовирусной активности препарат должен преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг инфицированных животных. Очевидно, что при в/б введении Ф-АЦГ в мозге животных создаются концентрации препарата, способные эффективно ингибировать репродукцию вируса. Однако биодоступность лекарственных препаратов при введении *per os* ниже, чем при в/б или внутривенном введении, и для сохранения антивирусной эффективности необходимо увеличивать дозу препарата. Например, биодоступность АЦВ при оральном приеме не превышает 10–20%. При приеме 200 мг препарата *per os* максимальная концентрация АЦВ в сыворотке крови составляет 0.4–0.8 мкг/мл. Внутривенное введение стандартной дозы АЦВ (5 мг/кг 3 раза в сутки) обеспечивает существенно большую его концентрацию в сыворотке крови – около 9.8 мкг/мл [26]. В ряде случаев пероральное введение оказывается неэффективным. Так, из-за крайне низкой биодоступности при введении *per os* (< 5%) препарат ЦДВ вводится только внутривенно [27]. Биодоступность ПЦВ при оральном введении также очень низкая – 5% [28]. В связи с этим перорально ПЦВ применяют только в виде метаболитического предшественника – фамцикловира. Структурные модификации позволяют увеличить абсолютную биодоступность ПЦВ из фамцикловира до 77% после однократного орального введения [29].

Поэтому, развивая логически проведенное нами исследование антигерпетической активности Ф-АЦГ *in vitro* и *in vivo* [18, 19], мы изучили способность Ф-АЦГ, вводимого перорально, защищать мышей от гибели при экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной ВПГ-1.

Известно, что патогенность АЦВ-резистентных вариантов ВПГ, содержащих мутации в гене ТК, определяется их фенотипом, так как зависит от уровня активности ТК. В опытах на лабораторных животных показано, что у ТК-негативных и ТК-дефицитных штаммов вирулентность, как правило, существенно снижена или такие штаммы авирулентны, т.е. не способны вызывать летальную инфекцию у лабораторных животных и проявляться в виде зостерформы [30, 31]. Как отмечалось, использованные в предыдущей серии опытов резистентные к АЦВ штаммы ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, Avd и Sha относятся именно к ТК-негативному или ТК-дефицитному фенотипам, поэтому в дальнейшем мы инфицировали животных исходным родительским штаммом ВПГ-

1/L<sub>2</sub> с неизменной лекарственной чувствительностью. Хотелось бы подчеркнуть, что способность ТК-дефицитных и ТК-негативных штаммов вызывать тяжелые клинические формы герпетической инфекции обусловлена их естественной гетерогенностью. Присутствие в популяции ТК-позитивных вирусных частиц, способных синтезировать функционально активную ТК, позволяет компенсировать отсутствие или низкий уровень активности ТК АЦВ-резистентных вирусных частиц [6, 32].

Инфицированные животные в опытных группах получали Ф-АЦГ в виде раствора в трижды дистиллированной воде как описано в разделе «Экспериментальная часть». При выборе разовых доз Ф-АЦГ опирались на данные об эффективности препарата при в/б введении на модели экспериментальной инфекции мышей, вызванной ВПГ-1: способность Ф-АЦГ защищать инфицированных животных от гибели была в 3–4 раза ниже по сравнению с АЦВ [18].

Из представленных в табл. 2 результатов видно, что в предложенных экспериментальных условиях перорально введенный Ф-АЦГ эффективно защищает животных от гибели. Защитный эффект носит при этом выраженный дозозависимый характер: при увеличении дозы Ф-АЦГ увеличивались и показатели выживаемости и СПЖ животных, что обусловлено ингибированием репродукции вируса в мозге инфицированных животных. Однако эффективность Ф-АЦГ при пероральном введении была ниже, чем при в/б, при практически равной смертности животных в контрольных группах. Так, при 57% смертности в контроле, из 40 животных, получавших препарат *per os* в дозе 300 мг/кг, погибло 29. Эффективность Ф-АЦГ при в/б введении в той же разовой дозе и по той же схеме была существенно выше – погибла лишь одна мышь из 40. Смертность в контроле в этом случае составляла 60% [19].

Снижение эффективности Ф-АЦГ и АЦВ при пероральном введении (2 раза в сутки, 5 дней) по сравнению с в/б введением по той же схеме в обоих случаях оказалось примерно одинаковым: пероральная эффективность АЦВ была в 3–4 раза ниже, чем интраперитонеальная. Так, в соответствии с нашими данными, при в/б использовании АЦВ в разовой дозе 25 мг/кг защитный эффект составлял 30%, а увеличение СПЖ – 5.2 суток при 65% смертности в контрольной группе [33], что хорошо сопоставимо с показателями эффективности АЦВ, вводимого мышам *per os* в разовой дозе 100 мг/кг (табл. 2).

Важно подчеркнуть, что эффективность Ф-АЦГ при его пероральном введении в разовой дозе 300 мг/кг хорошо сопоставима с эффективностью АЦВ в разовой дозе 100 мг/кг, вводимого по той же схе-

ме и в тех же экспериментальных условиях. Защита животных от гибели составляла в последнем случае 21.67%, увеличение СПЖ – 3.7 суток, снижение титра вируса в головном мозге – 0.73 lg.

При сопоставлении этих данных с результатами, приведенными в табл. 1, видно, что различие показателей эффективности Ф-АЦГ и АЦВ на модели генерализованной герпетической инфекции оказалось менее существенным, чем в опытах *in vitro*. Возможно, структурная модификация молекулы АЦВ (введение Н-фосфонатной группы) приводит к изменению фармакокинетических параметров препарата, например, повышает его биодоступность при пероральном введении.

Антивирусный эффект Ф-АЦГ в разовой дозе 500 мг/кг при пероральном способе введения приближался к эффекту Ф-АЦГ в дозе 300 мг/кг при в/б введении (погибли три мыши из 40). Показатели СПЖ и снижение титра вируса в головном мозге также были сопоставимыми (отличие СПЖ от контроля составило 9.64 и 8.43 суток, а снижение титра вируса 3.47 и 2.15 lg БОЕ/мл (в/б и пероральное введение соответственно). Таким образом, можно заключить, что противогерпетическая эффективность Ф-АЦГ при пероральном введении снижена менее чем в 2 раза по сравнению с интраперитонеальным. Поскольку пероральный способ введения более удобен, не требует участия квалифицированного медперсонала и безболезнен, то полученные результаты могут представлять практический интерес.

Наиболее широко распространенными формами герпетической инфекции являются поражения кожи и слизистых, не затрагивающие внутренние органы и ЦНС. Например, рецидивы орофациального герпеса (герпеса *labialis*) наблюдаются у 15–45%

взрослого населения [34]. Так как герпетические поражения в большинстве случаев локализованы на ограниченной площади, то системное введение противогерпетических препаратов может быть нецелесообразным. Оптимальными лекарственными формами в этом случае будут мази, кремы и гели для наружного нанесения. В случае эффективного проникновения лекарства через кожу подобный способ не только гарантирует направленное избирательное воздействие непосредственно на пораженные ткани, но и позволяет обеспечить терапевтическую концентрацию антивирусного агента в очаге инфекции при использовании в существенно меньших дозах, чем при системном введении. Следовательно, уменьшается токсическое воздействие препарата на организм, минимизируется риск развития нежелательных побочных эффектов, и, что также немаловажно, снижается стоимость курса терапии. Поэтому на следующем этапе исследований нам представлялось целесообразным изучить эффективность Ф-АЦГ при использовании в виде мазевой лекарственной формы.

Так как экспериментальная кожная инфекция ВПГ морских свинок вызывается тем же вирусом, что и у человека, а ее проявления сходны с клиническим течением кожной герпетической инфекции у человека, то для изучения противогерпетической активности веществ мы использовали эту модель.

Предварительно на интактных морских свинках оценили безопасность накожных аппликаций 5 и 10% мазей Ф-АЦГ, а также ПЭГ-600, служившего в наших экспериментах мазевой основой. Мази наносили на депилированные участки кожи дважды в день в течение 5 дней. Не обнаружено покраснения или изъязвления кожных покровов в месте нанесе-

Таблица 2. Влияние перорально введенного Ф-АЦГ на выживаемость мышей BALB/c (8. 41 ± 0.31 г), инфицированных ВПГ-1/L<sub>2</sub>

Соединение	Схема и доза введения Ф-АЦГ	Число выживших животных / число животных в группе	Смертность, %	Защита, %	СПЖ, сутки	Титр вируса в головном мозге, lg БОЕ/мл
- (контроль вируса)	-	26/60	56.67 ± 3.33	-	11.35 ± 1.11	4.18 ± 0.18
Ф-АЦГ	300 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	29/40	27.50 ± 2.50	29.17	16.40 ± 1.15	3.06 ± 0.12
Ф-АЦГ	400 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	33/40	17.50 ± 2.50	39.17	18.13 ± 1.00	2.56 ± 0.05
Ф-АЦГ	500 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	37/40	7.50 ± 2.50	49.17	19.78 ± 0.69	2.03 ± 0.15
АЦВ	100 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	14/40	35 ± 0	21.67	15.05 ± 1.30	3.45 ± 0.05

Примечание. Инфицирующая доза 4 × 10<sup>6</sup> БОЕ/мышь (титр вирусосодержащего материала 7.30 lg БОЕ/мл). Представлены результаты двух независимых опытов.

ния мази, изменения поведения животных, снижения аппетита.

Для оценки эффективности мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ животных инфицировали как подробно описано нами ранее [35] и приведено в разделе «Экспериментальная часть». Для предупреждения развития генерализованной инфекции, приводящей к гибели животного от энцефалита, мы использовали культуральный вирус ВПГ-1/L<sub>2</sub>, менее нейровирулентный, чем свежие клинические изоляты, или лабораторный вирус, прошедший пассирование через мозг мышей.

Так как точный расчет дозы препарата при местном использовании невозможен, испытуемые мази наносили тонким слоем непосредственно на пораженные участки кожи. В контроле в тех же условиях наносили плацебо в виде мазевой основы ПЭГ-600, не содержащей лекарственное средство.

Визуальную оценку клинических проявлений экспериментальной инфекции проводили ежедневно. В контроле на 3-и сутки (72 ч после инфицирования) развивались характерные для герпетической инфекции локальные поражения – пузырьковые высыпания (везикулы) около 2 мм как сгруппированные, так и одиночные. Еще через 24 ч (4-й день инфекции) интенсивность поражения достигала максимального развития, после чего начиналось постепенное подсыхание герпетических везикул с образованием корочек. Через 7–8 суток после инокуляции вируса начиналось обратное развитие процесса (отторжение

корочек). На 12-й день наблюдалась полная реэпителизация.

Для количественной характеристики активности соединения учитывали как достоверное уменьшение тяжести клинических симптомов инфекции, так и сокращение сроков излечения под действием изучаемого вещества по сравнению с показателями в контроле. Соответствующие результаты приведены в табл. 3.

При использовании мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ (5%) через 2 суток (4 дня после инокуляции вируса) средняя площадь поражения в опыте была на 5.76% меньше, чем в контроле ( $P < 0.05$  при оценке с использованием  $t$ -теста Стьюдента), а количество герпетических высыпаний составило 95.55% по сравнению с контролем ( $P < 0.3$ ). Сроки начала обратного развития процесса и излечения (полная реэпителизация) при использовании 5% мази Ф-АЦГ сокращались на 1 сутки по сравнению с контролем.

Лечебное действие Ф-АЦГ было более выраженным при его применении в виде 10% мази и было хорошо сопоставимым с эффектом 5% мази АЦВ. В течение всего срока наблюдения в обоих случаях отмечалось более легкое клиническое течение инфекции, что выражалось в снижении как количества везикулярных образований, так и площади поражения. Различие показателей, полученных в опытной и контрольной группах, оказалось статистически значимым ( $P < 0.05$  при использовании  $t$ -критерия Стьюдента). Обратное развитие процесса и излече-

**Таблица 3.** Сравнение лечебного эффекта мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ и АЦВ на экспериментальной модели кожной герпетической инфекции морских свинок, вызванной ВПГ-1/L<sub>2</sub>

Соединение	Концентрация соединения в мази, %	Площадь пораженной поверхности		Количество герпетических высыпаний		Титр вируса в везикулярной жидкости, lg БОЕ/мл	Начало обратного развития процесса, сут	Полная реэпителизация, сут
		S <sub>ср</sub> , см <sup>2</sup>	снижение относительно контроля, %	n <sub>ср</sub>	снижение относительно контроля, %			
- (контроль)	0	4.62 ± 0.08	-	11.25 ± 0.49	-	4.11 ± 0.10 (3.78–4.54)	7–8	12
Ф-АЦГ	5	4.36 ± 0.07	5.76	10.75 ± 0.31	4.44	4.00 ± 0.08 (3.60–4.38)	6	11
	10	4.22 ± 0.07	8.60	10.00 ± 0.27	11.11	3.85 ± 0.11 (3.54–4.40)	6	11
АЦВ	5	4.30 ± 0.18	6.95	10.00 ± 0.38	11.11	3.89 ± 0.15 (3.40–4.48)	6	11

Примечание. Мазь наносили 2 раза в день в течение 5 суток. Первое нанесение – через 48 ч после инфицирования, когда появляется легкое покраснение. Результаты учитывали через 4 суток после инфицирования. Титр вируса в везикулярной жидкости определяли через 4 суток после инокуляции, когда в контроле клиническая выраженность герпетических проявлений была максимальной.

Представлены результаты двух независимых опытов.

ние морских свинок наступало на 1 сутки раньше, чем в контроле.

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что во всех случаях использование мазевой лекарственной формы не приводило к существенному снижению инфекционного титра вируса в везикулярной жидкости. Поэтому нельзя утверждать, что способность Ф-АЦГ ингибировать развитие кожной герпетической инфекции, вызванной у морских свинок эталонным штаммом ВПГ-1/L<sub>2</sub>, происходит благодаря ингибированию репликации вируса в очаге инфекции. Однако полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными данными о влиянии АЦВ при местном использовании на инфекционный титр ВПГ в аналогичных экспериментальных условиях. При этом обнаружено статистически значимое уменьшение количества герпетических везикулярных образований и площади пораженной поверхности [36–38]. Вероятно, действие Ф-АЦГ при местном использовании носит прежде всего профилактический характер, что выражается в предотвращении формирования герпетических высыпаний при нане-

нии препарата в продромальный период на стадии легкого покраснения, а не в ингибировании репликации вируса в уже образовавшихся везикулах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение эффективности лечебного действия Ф-АЦГ в опытах *in vivo* показало, что при использовании *per os* или в виде мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ эффективно воздействует на генерализованную и кожную инфекцию, вызванную ВПГ-1. Несмотря на то что это соединение уступает АЦВ (для достижения хорошо сопоставимого лечебного эффекта необходимо увеличить концентрацию Ф-АЦГ в 2 раза), оно способно ингибировать репродукцию вариантов вируса, резистентных к АЦВ, как показано нами в опытах *in vitro* и *in vivo*. Это делает потенциально возможным использование Ф-АЦГ в случаях, когда АЦВ оказывается неэффективным. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-00198.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Díaz-Ramón J.L., Díaz-Pérez J.L. // Eur. J. Dermatol. 2008. V. 18. № 1. P. 108–111.
- Smith J.S., Robinson N.J. // J. Infect. Dis. 2002. V. 186. Suppl. 1. P. S3–S28.
- Pereira F.A. // J. Am. Acad. Dermatol. 1996. V. 35. № 4. P. 503–520.
- Danve-Szatanek C., Aymard M., Thouveno D., Morfin F., Agius G., Bertin I., Billaudel S., Chanzy B., Coste-Burel M., Finkielstein L., et al. // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. № 1. P. 242–249.
- Langston A.A., Redei I., Caliendo A.M., Somani J., Hutchinson D., Lonial S., Bucur S., Cherry J., Allen A., Waller E.K. // Blood. 2002. V. 99. № 3. P. 1085–1088.
- Andrei G., Georgala A., Topalis D., Fiten P., Aoun M., Opendakker G., Snoeck R. // J. Infect. Dis. 2013. V. 207. № 8. P. 1295–1305.
- Gateley A., Gander R.M., Johnson P.C., Kit S., Otsuka H., Kohl S. // J. Infect. Dis. 1990. V. 161. № 4. P. 711–715.
- Ljungman P., Ellis M.N., Hackman R.C., Shepp D.H., Meyers J.D. // J. Infect. Dis. 1990. V. 162. № 1. P. 244–248.
- Marks G.L., Nolan P.E., Erlich K.S., Ellis M.N. // Rev. Infect. Dis. 1989. V. 11. № 3. P. 474–476.
- Reardon J.E., Spector T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 13. P. 7405–7411.
- Gaudreau A., Hill E., Balfour Jr., H.H., Erice A., Boivin G. // J. Infect. Dis. 1998. V. 178. № 2. P. 297–303.
- Andrei G., De Clercq E., Snoeck R. // Antiviral Res. 2004. V. 61. № 3. P. 181–187.
- Sauerbrei A., Bohn K., Heim A., Hofmann J., Weissbrich B., Schnitzler P., Hoffmann D., Zell R., Jahn G., Wutzler P., et al. // Antivir. Ther. 2011. V. 16. № 8. P. 1297–1308.
- Lalezari J.P., Drew W.L., Glutzer E., Miner D., Safrin S., Owen W.F. Jr., Davidson J.M., Fisher P.E., Jaffe H.S. // J. Infect. Dis. 1994. V. 170. № 3. P. 570–572.
- Gibbs J.S., Chiou H.C., Bastow K.F., Cheng Y.C., Coen D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 18. P. 6672–6676.
- Larder B.A., Kemp S.D., Darby G. // EMBO J. 1987. V. 6. № 1. P. 169–175.
- Saijo M., Suzutani T., Morikawa S., Kurane I. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 2. P. 606–611.
- Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. // Вопр. вирусол. 2010. Т. 55. № 1. С. 31–34.
- Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Куханова М.К., Кочетков С.Н., Скоблов Ю.С. // Вопр. вирусол. 2011. Т. 56. № 5. С. 37–40.
- Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. № 3. С. 488–496.
- Karpenko I.L., Jasko M.V., Andronova V.L., Ivanov A.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Y.S. // Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids. 2003. V. 22. № 3. P. 319–328.
- De Clercq E., Descamps J., Verheist G., Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D. // J. Infect. Dis. 1980. V. 141. № 5. P. 563–573.
- McKeough M.B., Spruance S.L. // Arch. Dermatol. 2001. V. 137. № 9. P. 1153–1158.
- Sarisky R.T., Nguyen T.T., Duffy K.E., Wittrock R.J., Leary J.J. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. № 6. P. 1524–1529.
- Gus'kova A.A., Zagurnyĭ A.V., Skoblov M.Yu., Baranova A.V., Andronova V.L., Iankovskii N.K., Galegov G.A., Skoblov Yu.S. // Mol. Biol. 2005. V. 39. № 1. P. 155–158.
- Wagstaff A.J., Faulds D., Goa K.L. // Drugs. 1994. V. 47. № 1. P. 153–205.
- Cundy K.C. // Clin. Pharmacokinet. 1999. V. 36. № 2. P. 127–143.
- Harden M.R., Jarvest R.L. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 4265–4268.

29. Perry C.M., Wagstaff A.J. // *Drugs*. 1995. V. 50. № 2. P. 396–415.
30. Coen D.M. // *Trends Microbiol.* 1994. V. 2. № 12. P. 481–485.
31. Efsthathiou S., Kemp S., Darby G., Minson A.C. // *J. Gen. Virol.* 1989. V. 70. Pt. 4. P. 869–879.
32. Horsburgh B.C., Chen S.H., Hu A., Mulamba G.B., Burns W.H., Coen D.M. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 178. № 3. P. 618–625.
33. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. // *ДАН*. 2007. Т. 413. № 6. С. 830–834.
34. Harmenberg J., Oberg B., Spruance S. // *Acta Derm. Venereol.* 2010. V. 90. № 2. P. 122–130.
35. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В., Дерябин П.Г., Львов Д.К., Галегов Г.А. // *Вопр. вирусол.* 2013. Т. 58. № 1. С. 32–35.
36. Spruance S.L., Freeman D.J., Sheth N.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. V. 28. № 1. P. 103–106.
37. Spruance S.L., McKeough M.B., Cardinal J.R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984. V. 25. № 1. P. 10–15.
38. Spruance S.L., Freeman D.J., Sheth N.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986. V. 30. № 1. P. 196–198.

УДК 57.021.6:615.214.2

# Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Gly-дипептида

Ю. В. Вахитова<sup>1,2\*</sup>, С. В. Садовников<sup>2</sup>, С. С. Борисевич<sup>2,3</sup>, Р. У. Островская<sup>1</sup>, Т. А. Гудашева<sup>1</sup>, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450065, Уфа, просп. Октября, 71

<sup>3</sup>Уфимский институт химии РАН, 450065, Уфа, просп. Октября, 71

\*E-mail: juvv73@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2015

Принята к печати 10.09.2015

**РЕФЕРАТ** Изучено влияние Ноопепта (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов (ТФ) в клетках линии НЕК293, транзигентно трансфицированных люциферазными репортерными конструкциями, содержащими сайты связывания ТФ: CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1. Показано, что Ноопепт (10 мкМ) увеличивал ДНК-связывающую активность только HIF-1 и не влиял на активность CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. Выраженность HIF-позитивного эффекта Ноопепта зависела от его концентрации. В условиях стабилизации HIF-1, вызванной индуктором гипоксии CoCl<sub>2</sub>, Ноопепт обеспечивал дополнительное повышение ДНК-связывающей активности HIF-1. Пирацетам (1 мМ) не вызывал значимых изменений ДНК-связывающей активности ТФ. Результаты молекулярного докинга показали, что Ноопепт (L-изомер), а также метаболит Ноопепта – L-изомер N-фенилацетилпролина – способны связываться с активным сайтом пролилгидроксилазы 2. Данные о вызываемом Ноопептом селективном увеличении ДНК-связывающей активности HIF-1 с учетом функциональной значимости генов, активируемых этим фактором транскрипции, объясняют выявленные ранее нейрорхимические и фармакологические эффекты Ноопепта, что дает основание рассматривать HIF-позитивный эффект в качестве первичного механизма действия этого дипептида.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гипоксия, докинг, нейропротекция, Ноопепт, пролилгидроксилаза, транскрипционный фактор HIF-1.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CREB – белок, связывающий cAMP-зависимый элемент (cAMP-responsive element-binding protein); NFAT – ядерный фактор активированных T-клеток (nuclear factor of activated T-cells); NF-κB – транскрипционный фактор (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells); STAT1 – фактор транскрипции, преобразователь сигналов и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription); GAS – последовательность, активируемая интерфероном γ (interferon-gamma-activated sequence); VDR – рецептор витамина D (vitamin D3 receptor); HSF1 – транскрипционный фактор, регулирующий синтез белков теплового шока (heat shock transcriptional factor 1); HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor 1).

## ВВЕДЕНИЕ

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) разработан в качестве лекарственного средства в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова. Синтез препарата основан на оригинальной гипотезе пептидного дизайна, согласно которой с использованием соответствующих аминокислот воспроизводятся структуры, близкие к известным психотропным средствам [1]. Непептидным про-

образом Ноопепта был ноотропный препарат Пирацетам. Фармакологическая активность нового соединения оказалась в целом сходной с активностью Пирацетама, однако она проявлялась в дозах в 1000 раз более низких [2, 3]. Кроме того, у Ноопепта более выражены анксиолитические [4] и нейропротективные свойства [5–7].

Клиническое изучение Ноопепта (ЛС 015770) подтвердило обнаруженные в эксперименте его ноотроп-

ные эффекты. У больных с мягкими когнитивными нарушениями цереброваскулярного и посттравматического генеза препарат ослаблял когнитивные нарушения, проявлял анксиолитическое и вегетостабилизирующее действие ([www.noopept.ru](http://www.noopept.ru)).

Механизм действия Ноопепта изучается со времени его синтеза. Установлено, что препарат усиливает экспрессию NGF и BDNF в гиппокампе [8], проявляет холино-позитивные свойства на поведенческом и нейрональном уровне [9], ослабляет окислительный стресс и усиливает активность антиоксидантных систем [7, 10], вызывает угнетение индуцируемых стрессом киназ pSAPK/JNK и pERK1 [11]. Однако изучение первичных взаимодействий Ноопепта более чем со 100 известными рецепторными образованиями, выполненное согласно нашему протоколу компанией CEREP (Франция), не привело к ожидаемому выявлению первичных мишеней. Вместе с тем, обнаруженный широкий спектр нейрохимических и фармакологических эффектов Ноопепта определил необходимость дальнейшего поиска его мишеней.

С целью получения более полной информации о мишенях Ноопепта мы проанализировали *in vitro* влияние препарата на ДНК-связывающую активность фармакологически значимых биомишеней – транскрипционных факторов (ТФ) CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1, HIF-1. Выявив избирательное влияние Ноопепта на HIF-1, мы изучили эффект препарата на активность этого транскрипционного фактора в условиях моделируемой гипоксии *in vitro*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеток

В работе использовали клетки линии НЕК293 (перевиваемые клетки почки эмбриона человека; Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина сульфата, 2,5 мкг/мл амфотерицина В («ПанЭко», Россия).

Влияние Ноопепта на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов изучали с использованием люциферазных репортерных конструкций, содержащих сайты связывания CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1 в соответствии с [12].

Для проведения трансфекций клетки линии НЕК293 рассаживали по  $4 \times 10^3$  клеток в лунки 96-луночных планшетов в 100 мкл среды DMEM

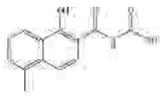
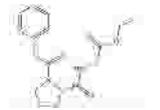
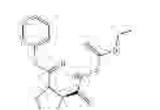
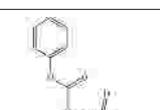
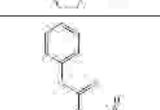
без антибиотика, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин. Репортерные векторные конструкции, содержащие сайты связывания транскрипционных факторов CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1, получены на основе плазмидного вектора pTL-Luc (Panomics, США; несет ген люциферазы *Photinus pyralis*) [13]. Клетки НЕК293 транзитивно трансфицировали данными конструкциями с помощью реагента Липофектамин 2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям изготовителя. Через 6 ч после трансфекции среду заменяли средой с антибиотиком (DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина сульфата) и через 18 ч добавляли изучаемые препараты (Ноопепт, 10 мкМ; Пирацетам, 1 мМ). Клетки инкубировали в присутствии Ноопепта или Пирацетама в течение еще 24 ч. Люциферазную активность в клеточных лизатах определяли с помощью набора Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) на планшетном анализаторе 2300 EnSpire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, США). В качестве внутреннего контроля трансфекции применяли котрансфекцию с плазмидой pRL-TK (Promega, США), кодирующей ген люциферазы *Renilla reniformis*. Значения люминесценции *P. pyralis* нормировали по люминесценции *R. reniformis* в каждом измерении.

Экспериментальное моделирование гипоксии осуществляли с использованием CoCl<sub>2</sub>, который вызывает стабилизацию HIF-1, т.е. является фармакологическим индуктором гипоксии [14]. Люциферазная конструкция для анализа активности HIF-1 содержит четыре копии консенсусной последовательности 5'-ACGTG-3' – сайта связывания белка HIF-1 (конструкция HIF-1-Luc). Клетки, трансфицированные плазмидным вектором HIF-1-Luc, предварительно инкубировали с Ноопептом в течение 8 ч (конечные концентрации 1, 10, 100 мкМ; двукратное внесение через каждые 4 ч), далее вносили индуктор гипоксии CoCl<sub>2</sub> в рабочей концентрации 50 мкМ и продолжали совместную инкубацию Ноопепта и CoCl<sub>2</sub> в течение 16 ч, после чего люциферазную активность определяли как описано выше.

### Статистический анализ

Среднее арифметическое значений, полученных по двум повторам в трех независимых экспериментах, и стандартную ошибку среднего рассчитывали с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft. Inc., США). Экспериментальные группы сравнивали с использованием парного *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

*In silico* оценка энергий взаимодействия лиганда и рецептора

Код лиганда	Структура лиганда	$\Delta G_{\text{FlexX}}^1$ кДж/моль <sup>1</sup>	RMSD <sup>2</sup>	$\Delta G_{\text{HYDE}}^3$ кДж/моль <sup>3</sup>	LE <sup>4</sup>
ZINC24800213		-31.8	0.42	-63	0.79 (B)
ZINC1542824_L		-17.0	0.48	-44	0.45 (CB)
ZINC3812682_D		-17.5	1.10	-42	0.42 (CB)
ZINC76075_L		-24.1	0.47	-38	0.53 (B)
PA2_L		-27.2	0.55	-49	0.55 (B)
PA2_D		-28.2	0.73	-41	0.47 (CB)

<sup>1</sup>  $\Delta G_{\text{FlexX}}$  – свободная энергия связывания, кДж/моль.

<sup>2</sup> RMSD – среднеквадратичное отклонение положения лиганда в активном сайте.

<sup>3</sup>  $\Delta G_{\text{HYDE}}$  – энергия сродства лиганда с сайтом связывания, кДж/моль.

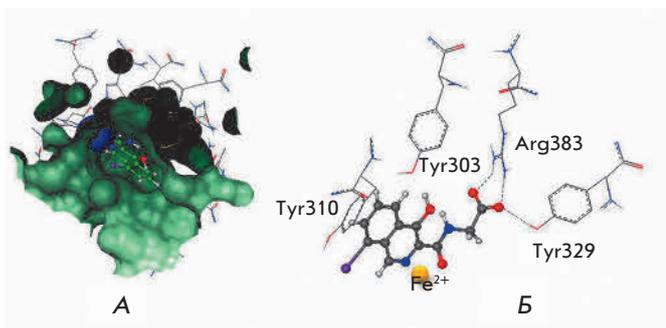
<sup>4</sup> LE – эффективность лиганда ( $LE = |\Delta G_{\text{HYDE}}|/N$  [22, 23], где  $N$  – количество тяжелых, т.е. не водородных атомов), при этом эффективность лиганда может быть оценена, как В – высокая эффективность, СВ – эффективность выше средней [22].

### Молекулярный докинг

Для построения и валидации модели докинга использовали данные о трехмерной структуре белка-мишени – пролилгидроксилазы 2 (PHD2; hypoxia-inducible factor-*L*-proline, 2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase [КФ 1.14.11.29]; код PDB: 2G19) – в комплексе с «нативным» ингибитором (код ZINC: 24800213; IC<sub>50</sub> 1.4 мкМ) [15, 16]. В качестве лигандов рассматривали: Ноопепт и его *D*-энантиомер (коды ZINC: 1542824 и 3812682 соответственно); метаболит Ноопепта *L*-*N*-фенилацетилпролин (код ZINC: 76075), а также стереоизомеры описанного ранее [31] ингибитора пролилгидроксилазы (шифры PA2L

и PA2D) (таблица). Геометрические параметры большинства молекул извлечены из базы данных ZINC [17] или смоделированы с помощью программы ChemCraft v1.7 [18] и оптимизированы методом HF/6-311G(d,p) в программе GAUSSIAN 09 C.01 [19]. Подготовка структур мишени и лигандов к докингу, как и все процедуры докинга, проведены с помощью программы LeadIT 2.1.8 [20]. Все квантово-химические расчеты проведены на кластерном суперкомпьютере Уфимского института химии РАН.

Область окружения «нативного» ингибитора (ZINC: 24800213) соседними аминокислотными остатками составляет 6.5 Å и содержит Arg383, Tyr310,



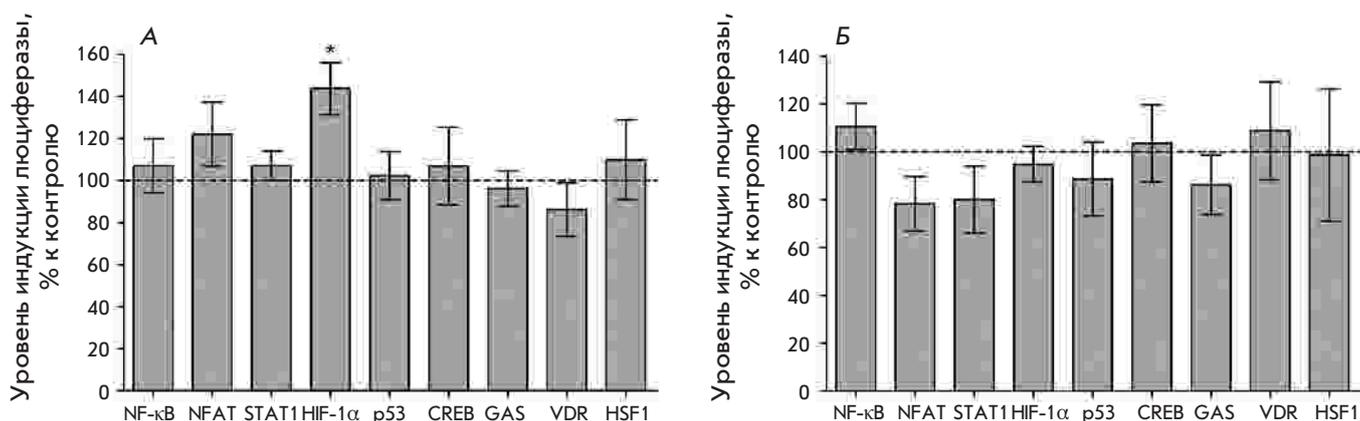
**Рис. 1.** Анализ активного сайта фермента пролилгидролазы 2. А – активный центр, занятый «нативным» лигандом. Б – взаимодействие ингибитора с аминокислотными остатками фермента (докинг-решение)

Tyr303 и Fe<sup>2+</sup>. Анализ активного центра фермента 2G19 показал, что Arg383 и Tyr329 образуют водородные связи с карбоксильной группой «нативного» ингибитора ZINC 24800213; Tyr310 и Tyr303 формируют π-π-электронное взаимодействие с ароматическими кольцами этого лиганда. Аминокислотные остатки Trp389, Trp258, Met299 и Ile256 образуют гидрофобный карман (рис. 1). При подготовке структуры фермента к процедуре докинга из активного центра удалили все молекулы воды. Редокинг «нативного» лиганда в активный сайт фермента PHD2 точно воспроизводит способ связывания лиганда и фермента, определенный кристаллографически. Среднеквадратичное отклонение составляет 0.44 Å. Подпрограмма FlexX [21] позволяет провести проце-

ду докинга лигандов (таблица) и оценить энергию связывания лиганда и рецептора в активном сайте. Количество докинг-решений может быть большим, и выбор оптимального решения основывается на минимальном значении энергии связывания в совокупности с минимальным значением среднеквадратичного отклонения (RMSD) позиции лиганда в сайте связывания. Далее выбранная позиция подвергается еще одному этапу расчета: оценке энергии сродства лиганда с сайтом связывания ( $\Delta G_{HYDE}$ , кДж/моль) и оценке эффективности лиганда [22, 23]. Подробный алгоритм расчета описан в работе [22]. Отмечается, что оптимальным является использование двух последовательных этапов выбора соединения-лидера среди лигандов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, представленные на рис. 2А, свидетельствуют о том, что инкубация с Ноопептом в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч увеличивала ДНК-связывающую активность HIF-1 на 43% и не вызывала статистически значимых изменений ДНК-связывающей активности факторов CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. Как следует из данных, представленных на рис. 3, Ноопепт в концентрации 10 и 100 мкМ увеличивал уровень индукции люциферазы. С использованием препарата сравнения показано, что Пирацетам ни в эквимолярной (10 мкМ, данные не представлены), ни в более высокой концентрации (1 мМ) не вызывает статистически значимых изменений ДНК-связывающей активности изученных транскрипционных факторов (рис. 2Б).



**Рис. 2.** Влияние Ноопепта, 10 мкМ (А) и Пирацетама, 1 мМ (Б) на базальную ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов NF-κB, NFAT, STAT1, HIF-1, p53, CREB, GAS, VDR, HSF1 *in vitro*. Статистическую значимость различий оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок ( $n = 3$ , \* $p < 0.05$ )

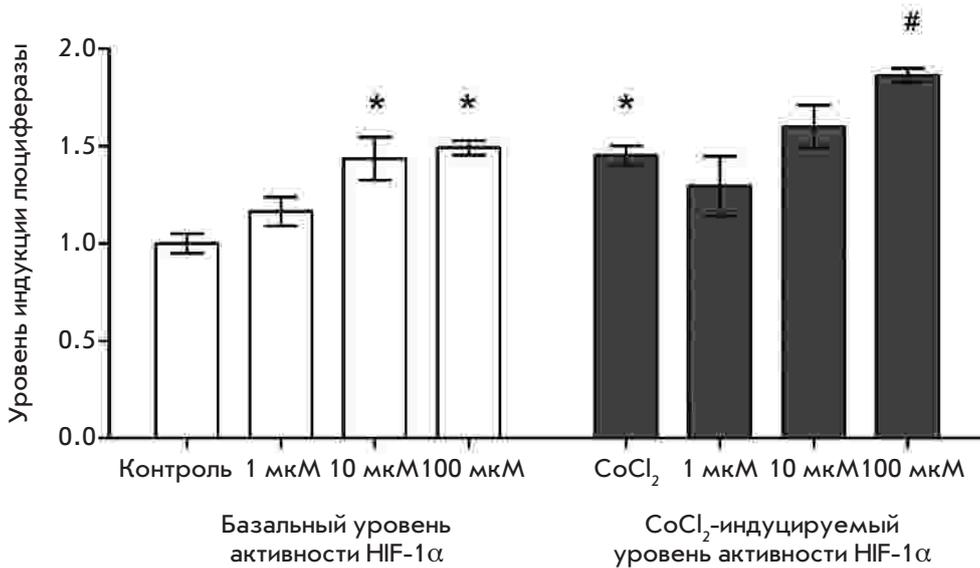


Рис. 3. Влияние Ноопепта на базальную и индуцированную активность HIF-1. Группа «контроль» – значения базальной активности HIF-1 в нестимулированных клетках; группа «CoCl<sub>2</sub>» – значения активности HIF-1 в CoCl<sub>2</sub>-стимулированных клетках. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n = 3; \*p < 0.05 по отношению к группе «контроль»; #p < 0.05 по отношению к группе «CoCl<sub>2</sub>»)

На следующем этапе работы анализировали влияние Ноопепта на ДНК-связывающую активность HIF-1 в присутствии фармакологического миметика гипоксии CoCl<sub>2</sub>. В полном соответствии с опубликованными данными на фоне действия CoCl<sub>2</sub> наблюдали повышение активности HIF-1. Добавление Ноопепта в концентрации 10 и 100 мкМ приводило к дополнительному увеличению HIF-1-зависимой люциферазной активности (рис. 3). Таким образом, впервые установлено, что Ноопепт обладает способностью увеличивать как базальную, так и индуцированную фармакологическим миметиком гипоксии активность HIF-1 *in vitro*.

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), является гетеродимером, состоящим из двух субъединиц – чувствительной к кислороду субъединицы HIF-1α и конститутивно экспрессирующейся HIF-1β. Гипоксия способствует возрастанию уровня HIF-1α, его димеризации с HIF-1β, мобилизации коактиваторов (p300/CBP) и связыванию этого комплекса с элементом HRE (hypoxia-response element) в регуляторных областях генов-мишеней. В нормоксических условиях зависимое от кислорода гидроксигидрирование остатков пролина в молекуле HIF-1α пролилгидроксилазами необходимо для связывания компонентом убиквитин-протеин-лигазы E3 – белком Гипшеля–Линдау (VHL). Убиквитинилированный HIF-1α становится мишенью для деградации 26S протеасомами. В присутствии кислорода остаток аспарагина в С-концевом транскрипторном домене (С-TAD) HIF-1α гидроксигидрируется аспарагингидроксилазой (FIH1, factor inhibiting HIF-1), что блокирует

его взаимодействие с коактиватором транскрипции p300/CBP. Таким образом, при нормоксии PHD и FIH инактивируют HIF-1α, подавляя зависимую от HIF-1 экспрессию генов-мишеней. В условиях гипоксии активность PHD и FIH снижается, что приводит к уменьшению деградации HIF-1α и запуску транскрипции зависимых от него генов [24]. Показано [25], что HIF-1 активирует в общей сложности до 100 генов. На рис. 4 представлены основные мишени HIF-1, к числу которых относятся гены, вовлеченные в процессы ангиогенеза за счет активации фактора роста эндотелия сосудов, усиления синтеза эритропоэтина, активации систем транспорта глюкозы через мембраны, цитопroteкции нейротрофическими факторами, нормализации клеточного цикла и метаболизма на уровне митохондрий, в том числе активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы. Совокупность этих эффектов обеспечивает осуществление адаптивной реакции на гипоксическое воздействие. Наряду с этим HIF-1 влияет на состояние многих нейротрансмиттерных систем – он активирует белок, контролирующий рецепторы ГАМК (GABA<sub>B</sub>BP) [26], повышает активность тирозингидроксилазы [27]. Описаны тесные взаимоотношения HIF-1 с холинорецепторами [28].

Как показано в нашей работе, Ноопепт вызывает зависимое от концентрации увеличение базальной ДНК-связывающей активности HIF-1. При стабилизации HIF-1 с помощью CoCl<sub>2</sub>, химического индуктора этого транскрипционного фактора [29, 30], Ноопепт обеспечивает дополнительное нарастание ДНК-связывающей активности HIF-1. Эффект в от-

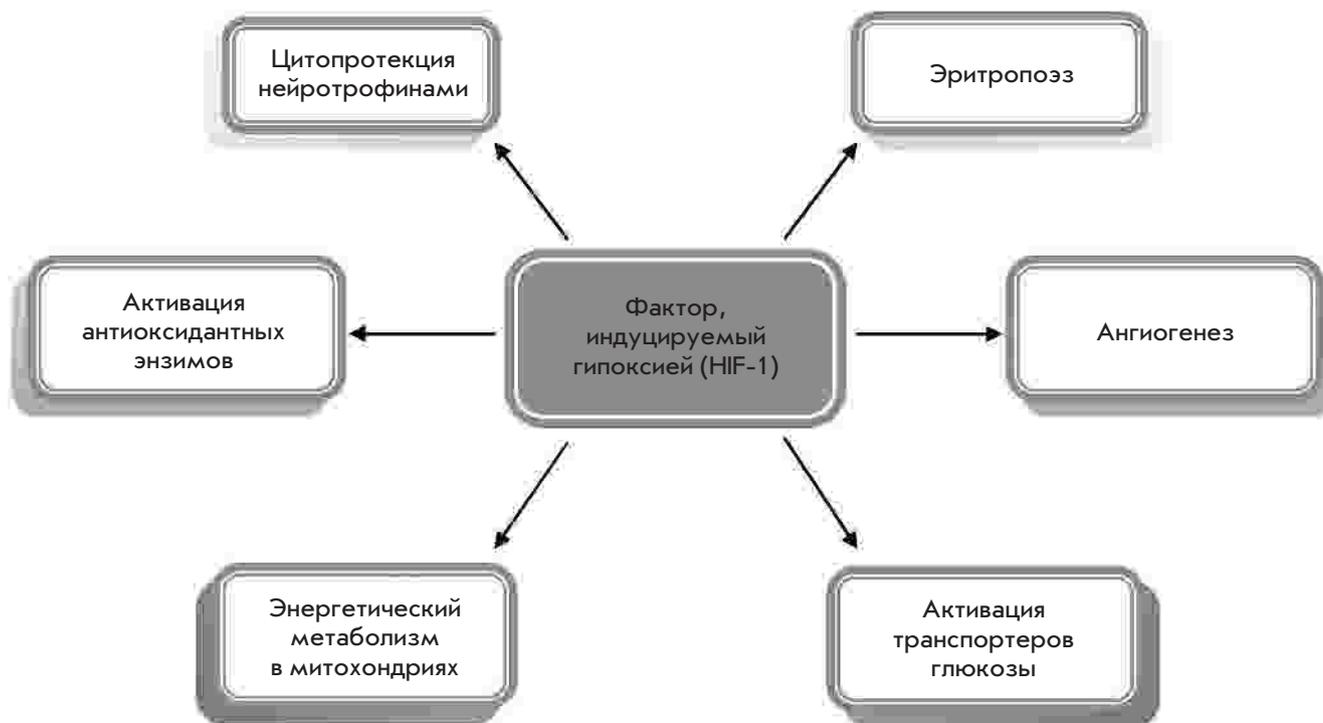


Рис. 4. Фактор, индуцируемый гипоксией HIF-1, и его мишени. Модифицировано по [35]

ношении HIF-1 специфичен для Ноопепта: классический ноотропный препарат Пирацетам не влияет на активность данного транскрипционного фактора. Ноопепт увеличивает ДНК-связывающую активность только HIF-1, тогда как активность других транскрипционных факторов (CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1) не повышается. Поскольку пролилгидроксилаза непосредственно участвует в деактивации HIF-1, а аналоги пролина описаны как эффективные ингибиторы этого фермента [31], можно предположить, что увеличение ДНК-связывающей активности HIF-1 при действии Ноопепта связано с ингибированием этого фермента.

Сопоставление структуры ингибиторов пролилгидроксилазы, представленных в работе Ма и соавт. [31], и метаболитов Ноопепта позволяет сделать вывод о сходстве соединения PA2 (бензилоксикарбонилпролин) с N-концевым фрагментом молекулы Ноопепта – N-фенилацетилпролином (таблица) [32, 33]. Следует принять во внимание, что диапазон концентраций, в которых PA2 угнетает пролилгидроксилазу ( $K_i = 2.38 \text{ мкМ}$ ,  $EC_{50} = 3.17 \text{ мкМ}$ ) [31], близок к выявленному нами уровню эффективных концентраций для Ноопепта.

Согласно результатам молекулярного докинга Ноопепт и L-изомер N-фенилацетилпролина связываются с активным центром пролилгидроксилазы

с эффективностью, сопоставимой с эффективностью L-изомера PA2L (таблица). Качественная оценка эффективности лиганда оценивается как высокая. L-стереоизомер N-фенилацетилпролина в активном сайте фермента формирует водородные связи с Arg383 и Tyr329, а молекула PA2L координируется атомами кислорода вокруг атома железа (рис. 5). Интересно отметить, что фармакологически неактивный D-изомер Ноопепта имеет более низкую энергию связывания. Таким образом, можно предположить, что Ноопепт и его метаболит – L-изомер N-фенилацетилпролина, могут связываться с активным сайтом пролилгидроксилазы 2 и, возможно, ингибировать ее ферментативную активность. Очевидно, что для окончательного заключения требуется экспериментальное изучение действия Ноопепта и его метаболита на активность пролилгидроксилазы. Дополнительного изучения также требует возможное взаимодействие Ноопепта с аспарагингидроксилазой.

Возвращаясь к вопросу о взаимодействии Ноопепта с HIF-1 (при отсутствии такого взаимодействия у Пирацетама), следует отметить, что Ноопепт сконструирован в качестве дипептидного аналога Пирацетама. Однако эффективные дозы Ноопепта на три порядка меньше, чем у Пирацетама [2]. Новый препарат и его непептидный

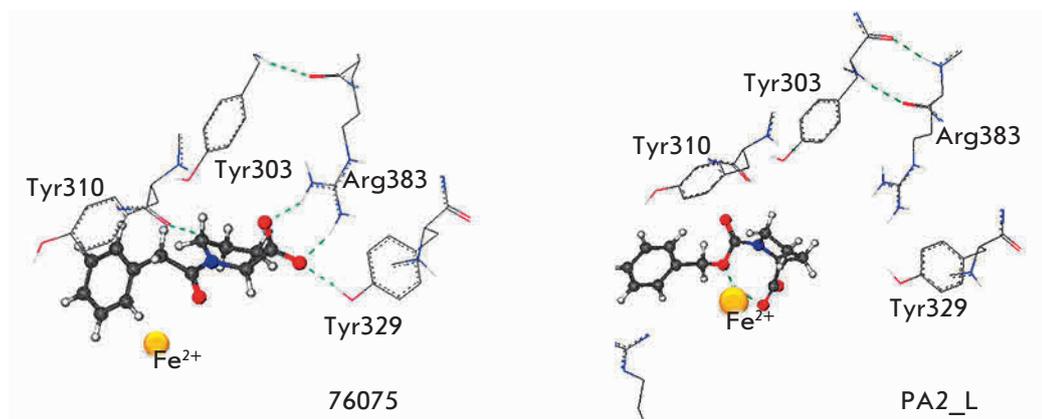


Рис. 5. Результаты молекулярного докинга: расположение лигандов в активном сайте пролилгидроксилазы (водородные связи показаны пунктирной линией)

прообраз различаются и по спектру фармакологической активности. Так, Ноопепт облегчал все фазы процессинга информации, а Пирацетам влиял преимущественно на начальные фазы [1]. Ноопепт проявляет выраженные нейропротективные свойства, тогда как у Пирацетама они, в зависимости от оцениваемого показателя, либо слабо выражены [7, 34], либо отсутствуют [35]. С фармакологических позиций такие различия должны иметь в своей основе особенности механизма действия, к которым можно отнести обнаруженный нами эффект взаимодействия Ноопепта с HIF-1.

Независимо от деталей указанного взаимодействия важно, что этот пролинсодержащий дипептид повышает активность HIF-1. Известно, что активация системы HIF рассматривается в настоящее время как один из основных механизмов нейропротекции при гипоксии, ишемии мозга, нейродегенеративных заболеваниях [24, 36]. В ходе многолетнего изучения именно эти состояния определили в качестве фармакологических мишеней действия Ноопепта на широком наборе соответствующих экспериментальных моделей.

Вслед за способностью Ноопепта повышать выживаемость животных в условиях гипербарической гипоксии [37], выявленной в самом начале изучения этого дипептида, было показано, что он уменьшает величину очага ишемического повреждения мозга на моделях циркуляторной гипоксии, например, кортикального фотоиндуцированного тромбоза [6] и перевязки среднелобной артерии [5]. Способность Ноопепта ослаблять выраженность окислительного стресса установлена как на нейрональных культурах различного типа: зернистых клетках мозжечка [35], культуре кортикальных нейронов абортинированных плодов с диагностированным синдромом Дауна [7], культуре PC12 [38] и культуре SH-SY5Y [39], так и в условиях целого организма в эксперименте на мозговой ткани и плазме крови крыс [40].

Способность усиливать активность супероксиддисмутазы и каталазы показана как в эксперименте [10], так и в клинических условиях [34].

На моделях болезни Альцгеймера выявлена способность Ноопепта не только устранять проявления когнитивного дефицита [41], но и оказывать нейропротективное действие, приводящее к ослаблению нарушений окислительных процессов и кальциевого гомеостаза, усилению нейрогенеза, предупреждению агрегации тау-белков, вызванной фрагментом  $\beta$ -амилоида<sub>25-35</sub> [38], устранению дефицита NGF и BDNF на фоне введения в желудочки мозга диабетогенного токсина стрептозотоцина [42]. Ноопепт способен уменьшать цитотоксический эффект агрегированного  $\alpha$ -синуклеина на клеточной модели паркинсонизма [39]. Все эти многочисленные эффекты могут быть объяснены активацией транскрипционного фактора HIF-1.

За последние годы нами показано, что Ноопепт оказывает антидиабетическое действие на модели стрептозотоцинового диабета [43]. Этот факт трактовался нами как результат многофакторного метаболического действия препарата – ослабления свойственного диабету дефицита антиоксидантных систем и нейротрофических факторов, усиленной продукции провоспалительных цитокинов [44]. Полученные в настоящей работе результаты привлекли наше внимание к данным о роли HIF-1 в развитии патологических процессов при сахарном диабете. Так, сообщается о способности инсулина нарушать образование HIF-1 и о роли дефицита этого фактора в развитии сахарного диабета типа 1 и 2, а также его осложнений [45]. Нарушение функции систем транспорта глюкозы GLUT1 и GLUT3 через клеточные барьеры, наблюдаемое при дефиците HIF-1, способствует развитию резистентности к инсулину как при болезни Альцгеймера, так и при сахарном диабете [46]. Доказано участие HIF-1 в экспрессии инкретинных – важнейших факторов цитопротекции

β-клеток поджелудочной железы [47]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что в реализации антидиабетического эффекта Ноопепта, в том числе в выявленной нами недавно способности этого препарата повышать уровень инкретина – глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) [44], участвует его HIF-1-позитивный эффект.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные о способности эффективного ноотропного и нейропротективного препарата Ноопепт вызывать увеличение ДНК-связывающей активности HIF-1 позволяют по-новому трактовать широкий спектр его действия, а именно, считать, что HIF-1-позитивный эффект препарата можно рассматривать как первичный механизм его действия. Уточнение молекулярных механизмов, лежащих в основе HIF-1-позитивного действия Ноопепта, безусловно, требует дальнейшего исследования, но наличие этого эффекта, несомнен-

но, имеет важное значение, поскольку позволяет объяснить практически все известные на сегодняшний день эффекты Ноопепта и, возможно, других биологически активных Pro-Gly-пептидов. Эти данные предоставляют дополнительные доказательства в пользу современных представлений о важной роли компонентов HIF-1-зависимого сигнального пути и запускаемых этим транскрипционным фактором компенсационных процессов в механизмах нейропротекции. ●

*Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель», Уфа) и УНУ «КОДИНК».*

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (НШ 5923.2014.4).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудашева Т.А. // Вестн. РАМН. 2011. № 7. С. 8–16.
2. Seredenin S.B., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Rozantsev G.G., Skoldinov A.P., Trofimov S.S., Halikas J., Garibova T.L. Biologically active N-acylprolyldipeptides having anti-amnesic, antihypoxic effects. Patent 5.439.930 USA. 1995.
3. Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U., Rozantsev G.G., Vasilevich N.I., Trofimov S.S., Kravchenko E.V., Skoldinov A.P., Seredenin S.B. // Eur. J. Med. Chem. 1996. V. 31. P. 151–157.
4. Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B., Voronina T.A., Molodavkin G.M., Gudasheva T.A. // In Animal models in biological psychiatry / Ed. Kalueff A.V. N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2006. P. 165–182.
5. Гаврилова С.А., Ус К.С., Островская Р.У., Кошелев В.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2006. Т. 69. № 4. С. 16–18.
6. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov I.V., Shanina E.V., Gudasheva T.A., Victorov I.V., Voronina T.A., Seredenin S.B. // Behav. Pharmacol. 1999. V. 10. P. 549–553.
7. Pealsman A., Hoyo-Vadillo C., Seredenin S.B., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Busciglio J. // Int. J. Dev. Neurosci. 2003. V. 21. P. 117–124.
8. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Цаплина А.П., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. // Бюл. эксп. биол. и мед. 2008. Т. 146. № 9. С. 309–312.
9. Островская Р.У., Мирзоев Т.Х., Фирова Ф.А., Трофимов С.С., Гудашева Т.А., Греченко Т.Н., Гутырчик Е.Ф., Баркова Е.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2001. Т. 64. № 2. С. 11–14.
10. Менджеридский А.М., Лысенко А.В., Демьяненко С.В., Прокофьев В.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У. // Нейрохимия. 2003. Т. 20. № 4. С. 281–286.
11. Островская Р.У., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Садовников С.В., Капица И.Г., Середенин С.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2010. Т. 73. № 12. С. 2–5.
12. Phippard D., Manning A.M. // Methods Mol. Biol. 2003. V. 225. P. 19–23.
13. Салимгареева М.Х., Садовников С.В., Фарафонтон Е.И., Зайнуллина Л.Ф., Вахитов В.А., Вахитова Ю.В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 219–225.
14. Piret J.P., Mottet D., Raes M., Michiels C. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. V. 973. P. 443–447.
15. Rose P.W., Prlić A., Bi C., Bluhm W.F., Christie C.H., Dutta S., Green R.K., Goodsell D.S., Westbrook J.D., Woo J., et al. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 345–356. <http://www.rcsb.org/>
16. McDonough M.A., Li V., Flashman E., Chowdhury R., Mohr C., Liénard B.M., Zondlo J., Oldham N.J., Clifton I.J., Lewis J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 26. P. 9814–9819.
17. Irwin J.J., Shoichet B.K. // J. Chem. Inform. Model. 2005. V. 45. P. 177–182.
18. Zhurko G.A., Zhurko D.A. // ChemCraft. v. 1.7. 2013.
19. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., et al. // Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2010.
20. Claussen H., Dramburg I., Gastreich M., Hindle S., Kaemper A., Kramer B., Lilienthal M., Mueller G., Rarey M., Wefing S., et al. // LeadIT. V. 2.1.8 BioSolveIT CmbH, 2014.
21. Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. // J. Mol. Biol. 1996. V. 261. P. 470–489.
22. Schneider N., Hindle S., Lange G., Klein R., Albrecht J., Briem H., Beyer K., Claußen H., Gastreich M., Lemmen Ch., Rarey M. // J. Comput Aided Mol. Des. 2012. V. 26. P. 701–723.
23. Kuntz I.D., Chen K., Sharp K.A., Kollman P.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 18. P. 9997–10002.
24. Semenza G. // Cell. 2012. V. 148. № 3. P. 399–408.
25. Zheng H., Fridkin M., Youdim M. // Persp. Med. Chem. 2015. V. 7. P. 1–8.
26. Park S.H., Kim B.R., Lee J.H., Park S.T., Lee S.H., Dong S.M., Rho S.B. // Cell Signal. 2014. V. 26. № 7. P. 1506–1513.
27. Schnell P.O., Ignacak M.L., Bauer A.L., Striet J.B., Paulding W.R., Czyzyk-Krzeska M.F. // J. Neurochem. 2003. V. 85. № 2. P. 483–491.

28. Hirota K., Ryo Fukuda R., Takabuchi S., Kizaka-Kondoh S., Adachi T., Kazuhiko Fukuda K., Semenza G.L. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 40. P. 41521–41528.
29. Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., et al. // *Cell.* 2001. V. 107. № 1. P. 43–54.
30. Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D.E. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 18. P. 15911–15916.
31. Ma X., Wang X., Cao J., Geng Z., Wang Z. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e95692.
32. Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Воронина Т.А., Розанцев Г.Г., Середенин С.Б. // *Эксп. клин. фармакология.* 1997. Т. 60. № 2. С. 101–104.
33. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akrapov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov S.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B. // *FEBS Lett.* 1996. V. 391. P. 149–151.
34. Федорова Т.Н., Ус К.С., Островская Р.У. // *Нейрохимия.* 2007. Т. 24. № 1. С. 69–73.
35. Андреева Н.А., Стемальшук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2000. Т. 130. № 10. С. 418–421.
36. Zhang Z., Yan J., Chang Y., ShiDu Yan S., Shi H. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. № 28. P. 4335–4343.
37. Фирова Ф.А. Спектр нейротропной активности оригинального замещенного пролил-дипептида ГВС-111: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: Ин-т фармакологии РАМН, 1994.
38. Ostrovskaya R.U., Vakhitova Y.V., Kuzmina U.Sh., Salimgareeva M., Zainullina L.F., Gudasheva T.A., Vakhitov V.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2014. V. 21. P. 74–82.
39. Jia X., Gharibyan A., Öhman A., Liu Y., Olofsson A., Morozova-Roche L.A. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 414. P. 699–712.
40. Лысенко А.В., Ускова Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. // *Эксп. клин. фармакология.* 1997. Т. 60. № 3. С. 15–18.
41. Ostrovskaya R.U., Gruden M.A., Bobkova N.A., Sewell R.D.E., Gudasheva T.A., Samokhin A.N., Seredenin S.B., Noppe W., Sherstnev V.V., Morozova-Roche L.A. // *J. Psychopharmacol.* 2007. V. 21. P. 611–619.
42. Островская Р.У., Цаплина А.П., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С. // *Эксп. клин. фармакология.* 2010. Т. 73. № 1. С. 2–6.
43. Островская Р.У., Озерова И.В., Гудашева Т.А., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2013. Т. 156. № 9. С. 317–321.
44. Островская Р.У., Золотов Н.Н., Озерова И.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Тарабан К.В., Мичунская А.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2014. Т. 157. № 3. С. 321–327.
45. Cheng K., Ho K., Stokes R., Scott C., Lau S.M., Hawthorne W.J., O'Connell P.J., Loudovaris T., Kay T.W., Kulkarni R.N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 6. P. 2171–2183
46. Liu Y., Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.X. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 359–364.
47. van de Velde S., Hogan M.F., Montminy M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 41. P. 16876–16882.

УДК 577.214.6

# Связывание белкового фактора CTCF в альфа-глобиновом локусе генома кур

Е. С. Котова<sup>1</sup>, С. Б. Акопов<sup>1</sup>, Д. А. Дидыч<sup>1</sup>, Н. В. Петрова<sup>2</sup>, О. В. Яровая<sup>2</sup>, С. В. Разин<sup>2</sup>, Л. Г. Николаев<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*E-mail: lev@ibch.ru

Поступила в редакцию 16.10.2015

Принята к печати 22.01.2016

**РЕФЕРАТ** В альфа-глобиновом локусе генома кур и окружающих областях с использованием метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности проведен систематический поиск фрагментов ДНК, содержащих потенциальные сайты связывания фактора транскрипции CTCF. При помощи иммунопреципитации хроматина проверена занятость белком CTCF таких сайтов в отобранных фрагментах в эритроидных и лимфоидных клетках. Лишь один из 13 фрагментов ДНК, связывающихся с CTCF *in vitro*, с высокой эффективностью взаимодействует с этим белком *in vivo* в эритроидных клетках и менее эффективно в лимфоидных. Таким образом, связывание CTCF с участком ДНК *in vitro* по большей части не означает, что этот участок будет занят CTCF в ядре клетки. Связывание же CTCF *in vivo*, как правило, сопровождается связыванием белка с данным участком *in vitro*. При эритроидной дифференцировке не происходит существенных изменений в связывании CTCF с исследованными фрагментами ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гены глобинов, фактор транскрипции CTCF, эритроидная дифференцировка.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** EMSA – сдвиг электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay); PBS – фосфатно-солевой буфер; AEBSEF – 4-(2-аминоэтил)бензилсульфонилфторид (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride); ChIP – иммунопреципитация хроматина (Chromatin Immunoprecipitation); ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим массированным секвенированием.

## ВВЕДЕНИЕ

Гены *HBZ*, *HBAD* и *HBAA*, кодирующие альфа-глобины, располагаются в альфа-глобиновом домене генома кур на хромосоме 14. Домен альфа-глобиновых генов кур относят к доменам открытого типа с присутствующими им особенностями: он располагается в богатой генами области, чувствителен к нуклеазам во всех типах клеток и реплицируется в начале S-фазы клеточного цикла. Кластер альфа-глобиновых генов фланкирован генами «домашнего хозяйства», которые активно транскрибируются во всех изученных типах клеток [1]. Примерно в 20 т.п.н. с 5'-стороны от глобиновых генов находится главный регуляторный элемент (MRE, major regulatory element) домена [2], включающий в себя эритроид-специфичный промотор полнодоменного транскрипта [3]. Эхансер и сайленсер, активные в эритроблестах кур, обнаружены вблизи 3'-конца гена *HBAA*. При эритроидной дифференцировке во всем домене меняется статус ацетилирования гистона H4 [4].

Фактор транскрипции CTCF считается одним из основных организаторов различных сетей регуляции генов, включая активацию и репрессию транскрипции, образование независимо функционирующих доменов хроматина, регуляцию импринтинга и т.д. Фундаментальные свойства CTCF позволяют ему действовать как фактору транскрипции, инсуляторному белку, а также как компоненту распределенных по геному пограничных элементов, способному привлекать различные факторы, появляющиеся в ответ на разнообразные внешние и внутренние сигналы [5, 6]. Ранее в альфа-глобиновом локусе кур были идентифицированы несколько сайтов связывания CTCF. Во-первых, это сайты M9 и C10–C14, связанные с CTCF в эритроидных и неэритроидных клетках и принадлежащие последовательностям с функциями инсуляторов [7], и CTCF-зависимый сайленсер (CDS, CTCF-Dependent Silencer [8]), связанный с CTCF в эритроидных клетках HD3 и 6C2. Кроме того, методом ChIP-seq выявлены несколь-

ко сайтов, связанных с СТСФ в эритроцитах пяти- и десятидневных эмбрионов кур (обозначены здесь 5d1–5d3, 10d1–10d3, см. [9]). Один из этих сайтов, 5d1/10d2, по-видимому, принимает участие в переключении активности глобиновых генов в процессе развития [10].

В настоящей работе предпринят систематический поиск потенциальных сайтов связывания СТСФ в альфа-глобиновом домене кур и окружающих областях при помощи разработанного нами ранее метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности (2D-EMSA, [11, 12]). Дальнейшее выявление среди отобранных фрагментов тех, которые связаны с СТСФ в клетках эритроидного и неэритроидного типа, проводили путем иммунопреципитации хроматина с анализом ПЦР в реальном времени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культуры клеток

Линию куриных эритробластов HD3, трансформированных вирусом эритробластопа птиц (клон А6 линии LSCC, см. [13]), и линию В-клеток кур DT40 (CRL-2111) выращивали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (Invitrogen) с добавлением 2% куриной и 8% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. При выращивании DT40 к среде дополнительно добавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 50 мкМ. Терминальную эритроидную дифференцировку клеток HD3 индуцировали инкубацией клеток в течение 12 ч в присутствии 20 мкМ ингибитора протеинкиназ iso-H-7 (1-(5-изохинолинсульфонил)-3-метилпиперазиндигидрохлорид, Sigma-Aldrich) при pH 8.0 и 42°C в 100% воздушной атмосфере как описано ранее [14]. Для контроля дифференцировки использовали окрашивание клеток бензидином [15]. К 25 мкл 0.4% (w/v) раствора бензидина (Sigma) в 4% уксусной кислоте добавляли 1 мкл 30% раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, смешивали с 25 мкл суспензии клеток, выдерживали в течение 10 мин и с помощью светового микроскопа выявляли бензидин-положительные клетки, окрашенные в темно-синий цвет. Доля гемоглобинсодержащих (бензидин-положительных) клеток составляла 21% после 12 ч инкубации. При этих условиях уровень транскрипции гена альфа-глобина близок к максимальному, но продолжает возрастать [16].

### Белок СТСФ и антитела к нему

Полноразмерный куриный белок СТСФ, содержащий полигистидиновую (6 × His) последовательность, был синтезирован в клетках COS-1 и частично очищен по описанному ранее методу [17]. Кроличьи поликлональные антитела к фрагменту куриного СТСФ (ами-

нокислотные остатки 86–233) приготовлены согласно [17, 18].

### Получение библиотеки коротких фрагментов альфа-глобинового локуса

ДНК клона CH261-75C12 искусственной бактериальной хромосомы (BAC, получена из CHORI BACPAC Resource Center, <https://bacpac.chori.org>), содержащую вставку альфа-глобинового локуса кур длиной 227366 п.н., очищали при помощи набора Plasmid Midi Kit (Qiagen) и обрабатывали нуклеазой Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase (Epicentre) в соответствии с рекомендациями производителей.

Библиотеку коротких фрагментов получали в основном согласно [19]. Два образца ДНК BAC расщепляли либо Sau3AI, либо Csp6I (Fermentas), к липким концам присоединяли библиотечный праймер ACTGAGGTCGACTATCCATGAACA. Полученные суббиблиотеки амплифицировали при помощи ПЦР (21–24 цикла) с использованием того же праймера и набора Encyclo PCR kit («Евроген») в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида по следующей схеме: 95°C, 30 с; 55°C, 30 с; 72°C, 90 с. Суббиблиотеки объединяли и очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

ПЦР-амплификацию фрагментов M9, CDS и HBAD на матрице полученных библиотек проводили с помощью набора Encyclo PCR kit («Евроген») в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида. Использовали следующие пары праймеров: TCAGGAAGAAAGAATGGGAAA и CCTGCGTTTTAGCTGATTGG для M9; TCCAGCACSTCGCAGTGCA и GCACAAGGCTCAAAGGTGAGACA для CDS; CCCAGACCAAGACSTACTTCC и GCTGAGGTTGTCCACGTTCTT для HBAD. Начиная с 24 цикла ПЦР, из реакционной смеси через каждые три цикла отбирали аликвоты по 2.5 мкл и анализировали их в 1% агарозном геле.

### Сдвиг электрофоретической подвижности (EMSA)

Отобранные фрагменты 1–13 амплифицировали на матрице плазмидной ДНК, выделенной из соответствующих клонов ранжированной библиотеки, с помощью ПЦР (10 циклов – 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 90 с) с использованием библиотечного праймера. Далее аликвоту реакционной смеси использовали для радиоактивного мечения в ходе ПЦР согласно [12]. Для сдвига электрофоретической подвижности ~5 нг (30000–50000 имп/мин) меченого фрагмента ДНК смешивали с 1 мкг поли(dI-dC), 1–2 мкг (по белку) ядерного или цитоплазматического экстракта или 2 мкл раствора очищенного белка СТСФ в 20 мкл конечного объема 12 мМ HEPES-КОН pH 7.9, 12%

глицерин, 60 мМ KCl, 0.3 мМ EDTA, 0.6 мМ DTT. Для дополнительного сдвига электрофоретической подвижности добавляли 4.5 мкг антител против CTCF или 3 мкг моноклональных антител к полигистидину (Sigma, H1029). Смесь инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, разделяли в 5–7.5% полиакриламидном геле, приготовленном на 50 мМ трис-боратном буфере pH 8.3, 0.5 мМ EDTA, и радиоавтографировали в течение 16–40 ч.

Двумерный сдвиг электрофоретической подвижности (2D-EMSA) проводили так, как описано нами ранее [12] с небольшими модификациями. ПЦР-амплификацию проводили в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида с использованием набора Encyclo PCR kit («Евроген»). Для первого раунда двумерного EMSA использовали 10 мкл белковой фракции, содержащей около 0.5 пмоль CTCF, для второго раунда – 1 мкл той же фракции. Полученную библиотеку CTCF-связывающих фрагментов ДНК клонировали в плазмиду pGEM-T (Promega) и ранжировали в 96-луночных планшетах. Секвенировали 230 клонов и картировали их на геноме кур (сборка galGal4).

### Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

Иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с описанной ранее методикой [20]. Примерно  $3 \times 10^7$  клеток на стадии экспоненциального роста (для DT40 и HD3) либо собранных через 12 ч после начала индукции (для индуцированных HD3) фиксировали 1% по объему формальдегидом в 60 мл среды DMEM/F12 (1 : 1) в течение 8 мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 4 мин при 700 *g* и 4°C, промывали PBS, содержащим 1 мМ AEBSF и 1 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, P8340), повторно осаждали, ресуспендировали в 200 мкл 50 мМ трис-HCl pH 8.0, 1 % SDS, 10 мМ EDTA и инкубировали в течение 10 мин на льду для лизиса. Далее клетки обрабатывали ультразвуком при помощи процессора Cole-Parmer CP750 (амплитуда 30%, 30 циклов по 3 с с интервалом 10 с). Обломки клеток удаляли в микроцентрифуге (10 мин, 13000 об/мин, 4°C), супернатант разводили в 10 раз 16.7 мМ трис-HCl pH 8.0, 16.7 мМ NaCl, 1.2 мМ EDTA, 1% Triton X-100, 0.01 % SDS, 1 мМ PMSF и 1 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз. На этой стадии отбирали аликвоту для входного контроля (input). Клеточный лизат очищали от неспецифически связавшихся белков преинкубацией с белок-А-агарозой (Invitrogen), а затем инкубировали с 2 мкг поликлональных антител к CTCF или контрольных кроличьих поликлональных антител к тауматину (предоставлены Е.А. Стукачевой) в течение ночи при 4°C и перемешивании. ДНК-белковые комплек-

сы собирали на белок-А-агарозе, промывали и элюировали с носителя буфером для элюции (1 % SDS, 0.1 М NaHCO<sub>3</sub>, 2 раза по 15 мин) при комнатной температуре. Затем к раствору добавляли NaCl до 0.2 М, последовательно РНК-азу А и протеиназу К, и инкубировали при 65°C в течение 4 ч для обращения шшивки. ДНК экстрагировали дважды смесью фенол-хлороформ и осаждали этанолом в течение ночи при 4°C в присутствии 20 мкг гликогена в качестве носителя. Фрагменты ДНК собирали центрифугированием, растворяли в воде и анализировали с использованием количественной ПЦР в реальном времени при помощи амплификатора MX3000P (Stratagene) и реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген») в объеме 25 мкл в течение 40 циклов – 95°C, 30 с; 61–65°C (для разных праймеров), 30 с; 72°C, 60 с. Эффективность ПЦР рассчитывали при помощи программы LinRegPCR [21].

При проведении количественной ПЦР в качестве положительного контроля использовали фрагмент F1 сайленсера гена лизоцима кур [22] и фрагмент промоторной области гена MYC курицы [23]. Не связывающиеся с CTCF фрагмент энхансера из бета-глобинового локуса кур [8] и участок экзона гена альфа-D-глобина (HBAD) использовали в качестве отрицательного контроля. Фрагменты ДНК амплифицировали на матрице геномной ДНК кур со следующими праймерами: CAGCACAGTTCTGGCТАТGAAA и CCTCAGCTGGGGTCAATAAGT (сайленсер гена лизоцима); AAGCAGCGAGGAGCGCCCTTT и TACTACAAGGAGAGGTCGGAAGT (промотор гена MYC); GGGCAGGTTGCAGATAAACA и TAACCCCTCTCTCCCTCA (энхансер из бета-глобинового локуса); CCCAGACCAAGACCTACTTCC и GCTGAGGTTGTCCACGTTCTT (экзон гена HBAD); TGTGGTCAATCCATGTCCTCAATC и GGAAGCTTTTGGSSAAGGAGAA для 10d1; GCTCTTCCCTACCCAGGTTTCT и CATCCAGCCCTCTCCAAACA (10d2, 8 и 5d1); TGACCCATCTTGCAATGGATACT и GTTTGGGAACSTCTCTCTCCATCC (10d3); ATAGGACTTCCCTGCTTCCATCT и GTTGGAGTGTGTGGTCTTCTCC (5d2); GTGAGGAGAGGGCGAAGTTTATT и GCTCCCTGAGCTCCTCACCT (5d3); A T A A C T T G G C A C G C A A A C T A G C A и TTTGGAAAGTGCTGTGGGTAAAG (фрагмент 1); TTCTACACTTGTCCCTCCTTTTCA и CCTATTTTGTGGCTGCATTCTTC (фрагмент 2); GGAGCTCAGCAGGCAGAAACTA и GCTAAGGCAAAGGCTCTGTTGT (фрагмент 3); CTCTGCATTGCTGTGTGTGTTTT и ATGGTGGTTATCTCAGGGGTTTT (фраг-

мент 4); GGTACGTTCTCAGTGCCCAAAC и CCACCTGCAGACСТААCCTGTC (фрагмент 5); CAGCTCTTCTGGCTCATTGTCT и ATCTCCSTTTTCAGTCCCSTTCTC (фрагмент 6); TTTCACCCCAAGAAGTTCATGCT и CCCAGTGTGGAAGCCATTTATC (фрагмент 7); CATGGGCAGCAAACACACAG и TCCATTTCCAGCGGTTCTTATC (фрагмент 9); AGGTAGGACTCAGCAGGGACAG и GGGACAAGTAGCTGGGACAAAA (фрагмент 10); CTGGAGATACCCATGGCAGAAC и TTTGTGGCCAACGTCAAACТАC (фрагмент 11); GGTTTGCSTTTCTTGCTCTG и ATGCCATCTCACTTGCTCT (фрагмент 12); CGTACCAGCACCAGACAAACAG и TCGACTGTTGAAGGAGGCATAA (фрагмент 13).

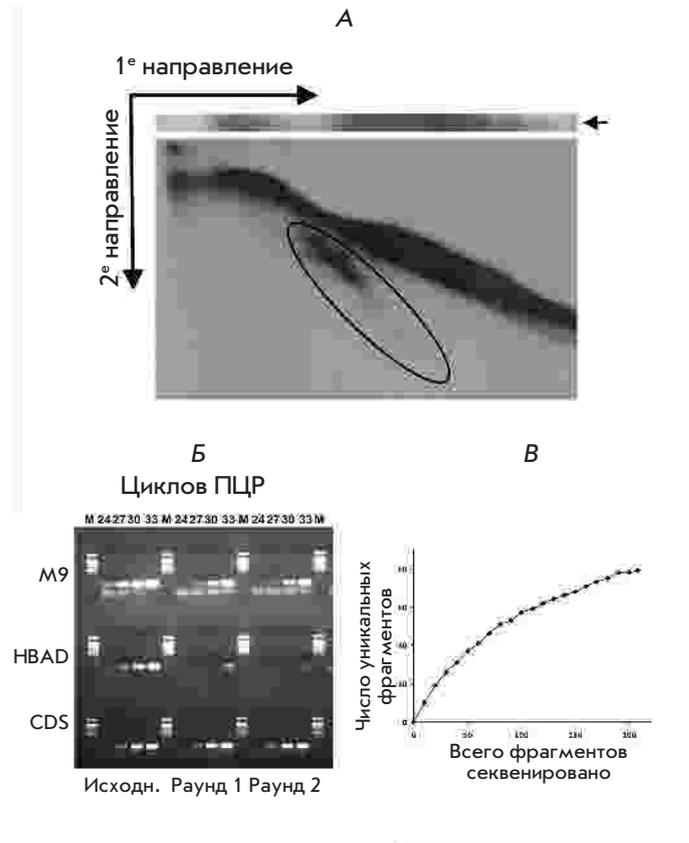
Данные анализировали при помощи ресурсов геномного браузера (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>) [24] и NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Отбор CTCF-связывающих последовательностей при помощи 2D-EMSA

Для получения библиотеки CTCF-связывающих последовательностей методом двумерного EMSA (2D-EMSA, см. [12]) искусственную бактериальную хромосому (BAC), содержащую вставку длиной 227366 п.н., полностью перекрывающую альфа-глобиновый локус кур и включающую обширные фланкирующие участки, исчерпывающе гидролизовали рестриктазой *Sau3AI* либо *Csp6I*. К полученным липким концам присоединяли синтетические адапторы, амплифицировали с помощью ПЦР, и оба гидролизата смешивали в равных количествах. Полученную библиотеку коротких фрагментов (около 1000 фрагментов со средней длиной ~500 п.н.) метили <sup>32</sup>P и смешивали с белковой фракцией, обогащенной полно-размерным CTCF, экспрессированным в клетках COS-1 [17]. Реакционную смесь далее разделяли электрофоретически в неденатурирующем полиакриламидном геле (в первом направлении). Полосу с образцом вырезали, инкубировали в содержащем SDS буфере для разрушения ДНК-белковых комплексов, и фрагменты ДНК разделяли в содержащем SDS геле (во втором направлении). Область, содержащую большинство фрагментов, исходно связанных с CTCF (обведена на рис. 1А), вырезали из геля, фрагменты ДНК элюировали и амплифицировали. Для повышения эффективности отбора процедуру повторяли.

Специфичность отбора проверяли при помощи амплификации полученной и исходной библиотек



**Рис. 1.** Приготовление и характеристики библиотеки CTCF-связывающих фрагментов ДНК. А – отбор CTCF-связывающих фрагментов методом двумерного сдвига электрофоретической подвижности (2D-EMSA). Показаны результаты двумерного электрофореза для второго раунда отбора. Овалом обведена область, содержащая отобранные CTCF-связывающие фрагменты. Детальное описание см. в тексте. Б – оценка степени обогащения библиотеки фрагментами, связывающими CTCF. Исходную ДНК и ДНК библиотеки после первого и второго раундов отбора при помощи 2D-EMSA использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами к CTCF-связывающим сайтам альфа-глобинового локуса кур: CDS (CTCF-зависимый сайленсер) и последовательности M9. Не способную связывать CTCF последовательность экзона гена *HBAD* использовали как отрицательный контроль. В – кривая разрежения, полученная в ходе секвенирования библиотеки CTCF-связывающих фрагментов

с праймерами к последовательностям альфа-глобинового локуса кур, связывающим CTCF согласно опубликованным данным: CDS (CTCF-зависимый сайленсер) [8] и M9 [7]. Последовательность экзона гена *HBAD*, не связывающую CTCF, использовали в качестве отрицательного контроля. Результаты амплификации представлены на рис. 1Б.

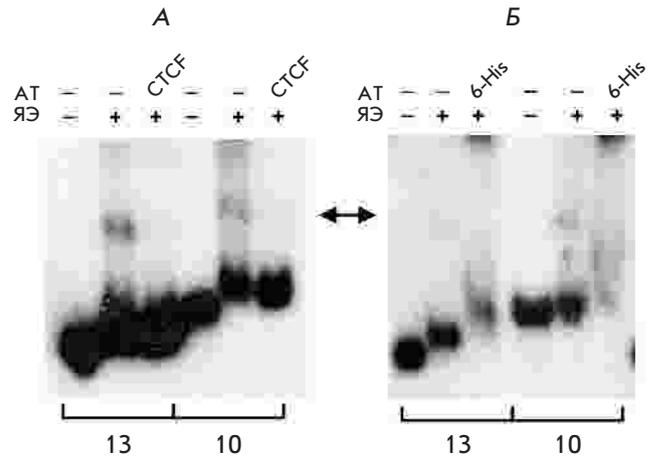
Как видно из *рис. 1*, после двух раундов отбора продукты ПЦР областей CDS и M9 становятся видимыми после 24 и 27 циклов амплификации соответственно, тогда как продукт контрольного, не связывающего CTCF участка гена *HBAD*, становится видимым лишь после 33 циклов. С учетом того, что все три фрагмента амплифицируются из исходной библиотеки с примерно равной эффективностью (см. исходную дорожку на *рис. 1Б*), можно грубо оценить, что обогащение конечной библиотеки CTCF-связывающими фрагментами составляет ~64–512 раз.

Фрагменты ДНК, полученные после второго раунда отбора, клонировали в вектор pGEM-T, белые колонии (230) распределяли по 96-луночным планшетам и секвенировали их вставки. Из этих последовательностей 22 соответствовали фрагментам ВАС, геномной ДНК *Escherichia coli* или химерным фрагментам, 208 принадлежали альфа-глобиновому локусу. Среди них выявлено 79 уникальных последовательностей. Построенная кривая разрежения (*рис. 1В*) указывает, что секвенирование произведено с глубиной, достаточной для идентификации большинства потенциальных CTCF-связывающих фрагментов локуса.

Десять отобранных фрагментов ДНК (1–4, 6–10, 13) использовали в качестве зондов для проверки методом сдвига и дополнительного сдвига электрофоретической подвижности (EMSA, supershift) их способности связываться с CTCF. Два фрагмента (10 и 13) представлены на *рис. 2*. Все 10 фрагментов были способны связывать CTCF, что свидетельствует о высокой эффективности отбора.

### Распределение потенциальных участков связывания CTCF

Все 208 секвенированных фрагментов были картированы на геноме кур (сборка galGal4, 2011 г.). Таблица с координатами всех картированных фрагментов ДНК в формате bed доступна по запросу. Полная карта распределения фрагментов приведена в верхней части *рис. 3*. Видно, что в локусе имеется ряд участков с повышенной эффективностью отбора (обозначены вертикальными стрелками), т.е. с повышенным сродством к CTCF в условиях EMSA. В нижней части *рис. 3* приведена подробная часть карты, непосредственно включающая гены глобинов, указаны положения генов (RefSeq), а также некоторых идентифицированных ранее регуляторных элементов, в частности энхансера/сайленсера [25] и MRE (Major Regulatory Element, [2]). Показаны также идентифицированные ранее в различных типах клеток и тканей участки ДНК, способные связывать CTCF: M9, C10–C14 [7] и участок CTCF-зависимого



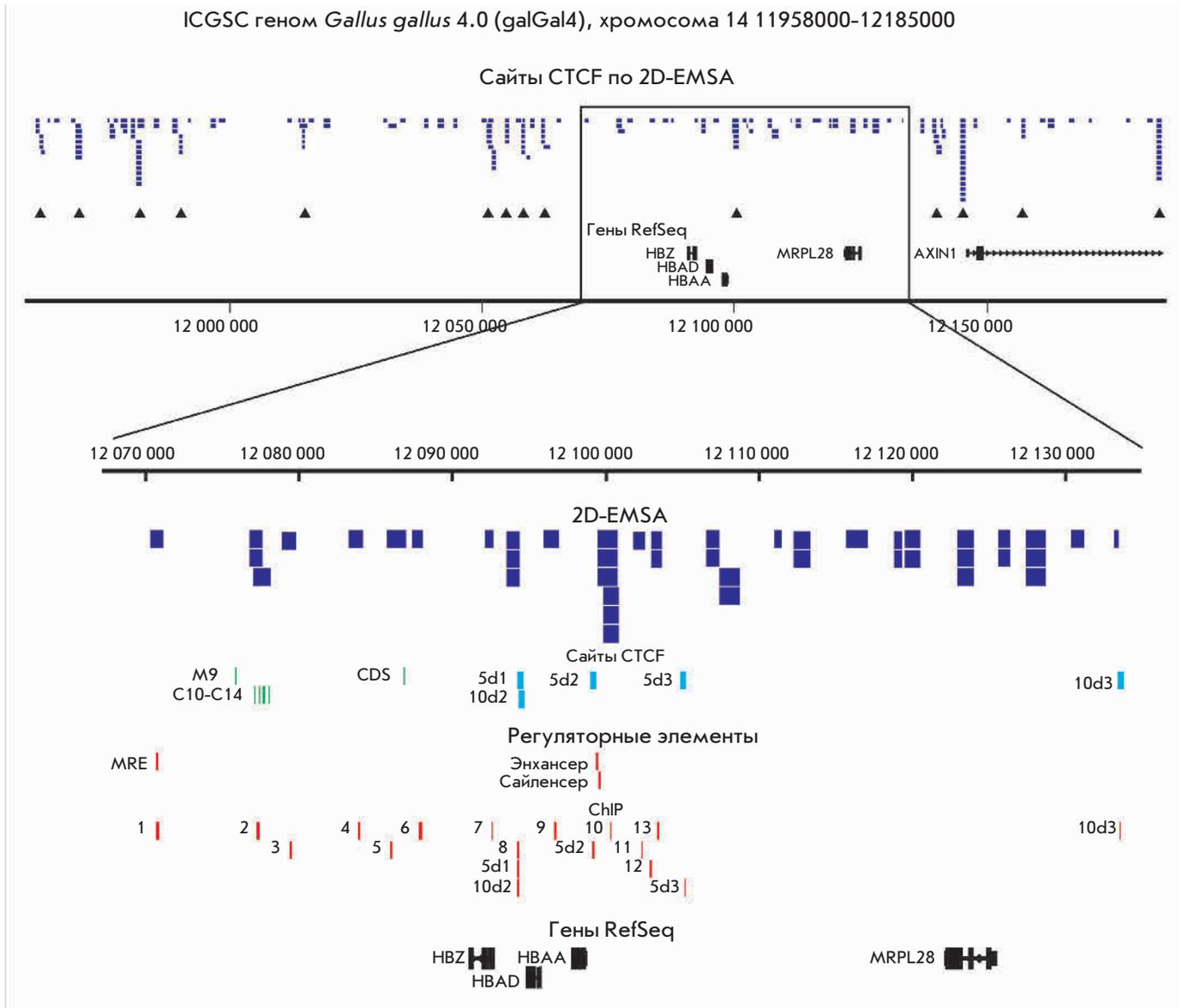
**Рис. 2.** Связывание CTCF с отобранными фрагментами ДНК 10 и 13. Использовали антитела к CTCF (А) и полигистидиновой последовательности (Б). АТ – антитела, ЯЭ – ядерный экстракт

сайленсера [8]. Участки связывания CTCF 5d1–5d3 и 10d1–10d3 выявлены ранее методом ChIP-seq в пяти- и десятидневных эмбрионах кур соответственно [9].

Как видно из *рис. 3*, подавляющее большинство найденных ранее сайтов связывания CTCF совпадает либо находится на очень небольшом расстоянии от участков с высокой эффективностью отбора, т.е. хорошо связывающихся с CTCF в условиях EMSA. Сайт связывания 10d1, расположенный за границей увеличенного участка карты, также совпадает по положению с участком повышенного сродства к CTCF. Отметим, что сайт связывания и место сшивки при иммунопреципитации хроматина могут не полностью совпадать из-за изгиба ДНК [26, 27], т.е. фрагменты, идентифицируемые по EMSA и ChIP, не обязательно перекрываются, хотя и должны находиться на небольшом расстоянии друг от друга.

### Связывание CTCF в области альфа-глобиновых генов *in vitro* и *in vivo*

Чтобы сравнить связывание CTCF с участками ДНК, обнаруживаемыми методом EMSA и выявляемыми в живой клетке методом ChIP, мы провели опыты по иммунопреципитации хроматина в 13 участках ДНК из области глобиновых генов, а также в участках 5d1–5d3 и 10d1–10d3 [9] в трех типах клеток – линии эритробластов HD3, той же линии, индуцированной к терминальной эритроидной дифференцировке (HD3-ind), и незритроидной линии DT40 В-клеток кур. Положение амплифицированных

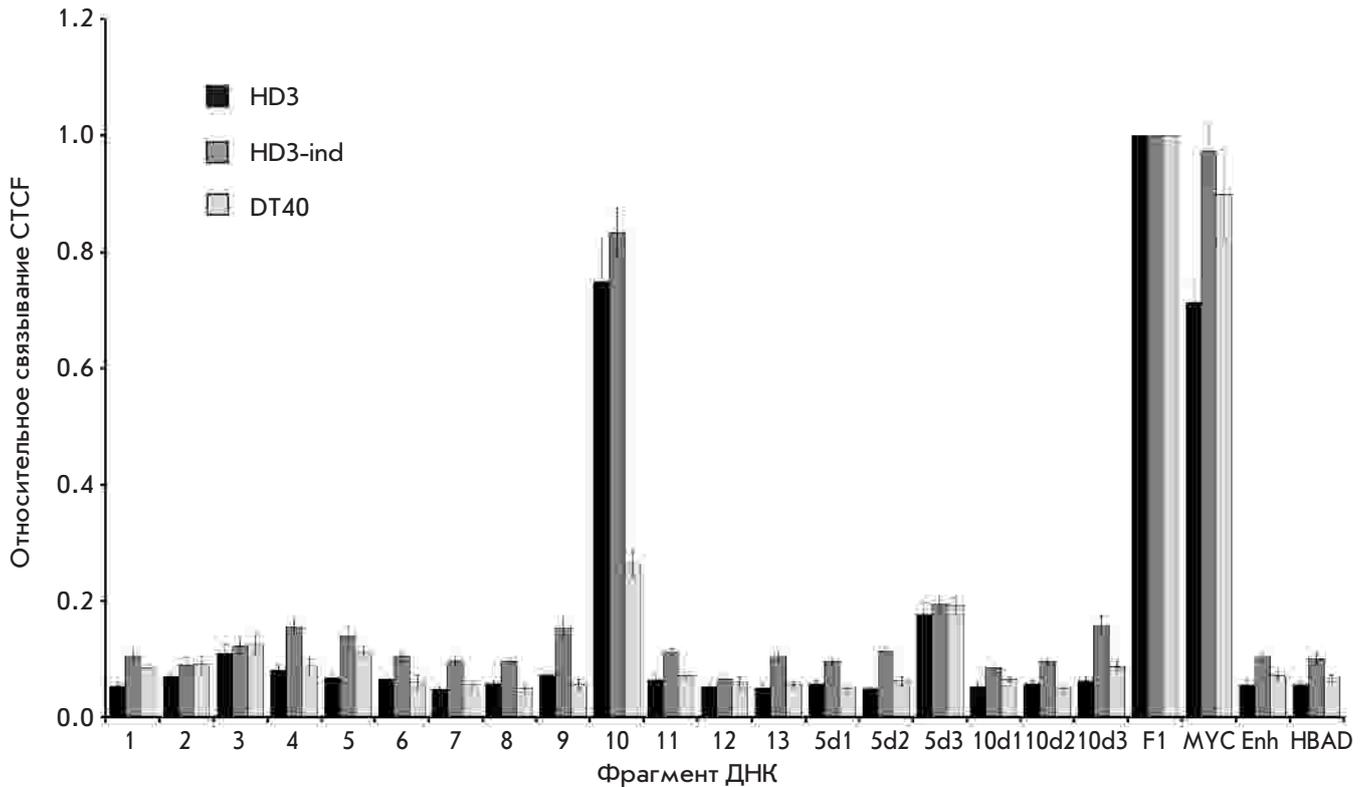


**Рис. 3.** Расположение сайтов связывания CTCF и других регуляторных элементов в области, окружающей альфа-глобиновый локус генома кур. На верхней карте показано расположение всех полученных при отборе фрагментов ДНК. Стрелки указывают участки ДНК с повышенным средством к CTCF. Ниже приведена увеличенная часть карты, представляющая непосредственное окружение глобиновых генов. В области «Сайты CTCF» показаны идентифицированные ранее сайты связывания CTCF M9, C10-C14 [7], CDS [8] и 5d1–5d3, 10d1–10d3 [9], в области «Регуляторные элементы» приведено расположение элементов MRE [2], энхансера и сайленсера [25]. В области ChIP указано расположение фрагментов ДНК, амплифицировавшихся в эксперименте по иммунопреципитации хроматина (см. текст)

при иммунопреципитации хроматина фрагментов ДНК приведено на *рис. 3* (панель ChIP), а результаты иммунопреципитации на *рис. 4*.

Из *рис. 4* видно, что высокая степень занятости сайтов белком CTCF, близкая к занятости в положительном контроле (F1, MYC), характерна только для фрагмента 10, расположенного вблизи 3'-конца

гена *HBAA*. Высокий уровень связывания CTCF наблюдается в клетках HD3 и индуцированных HD3, в клетках DT40 уровень связывания CTCF этим сайтом значительно ниже. Показательно, что фрагмент 10 по положению совпадает с фрагментом этой области генома с наиболее сильным связыванием CTCF *in vitro* (*рис. 3*).



**Рис. 4.** Связывание CTCF с участками ДНК *in vivo* по результатам иммунопреципитации хроматина с анализом при помощи ПЦР в реальном времени. Приведены результаты для клеток HD3, HD3, индуцированных к эритроидной дифференцировке, и лимфоидных клеток DT40. Использовали праймеры к отобранным в данной работе фрагментам ДНК (1–13), а также к шести фрагментам из работы [9] (5d1–5d3, 10d1–10d3). F1, MYC – положительный контроль; Enh, HBAD – отрицательный контроль. Данные нормированы относительно связывания CTCF фрагментом F1. Планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего

Кроме фрагмента 10, выделяется 5d3, степень связывания CTCF с которым уверенно выше значений отрицательного контроля для всех трех типов клеток, но существенно ниже, чем у фрагмента 10 в клетках HD3 и HD3-ind. Некоторое превышение над отрицательным контролем наблюдается у фрагментов 4, 5, 9 и 10d3 только в клетках HD3-ind, но степень этого превышения невелика и не позволяет с уверенностью утверждать, что эти фрагменты связывают CTCF.

Таким образом, большинство фрагментов ДНК (17 из 18), связывающихся с очищенным белком CTCF в условиях EMSA, не связывают CTCF в клеточном ядре использованных типов клеток. Этот факт может объясняться следующими причинами.

1. Метилирование цитозина в составе динуклеотида CpG в сайте нарушает связывание с ним CTCF [28, 29]. Однако лишь около 30% сайтов связывания CTCF содержат последовательность CpG [30], так что метилированием ДНК в сайте CTCF полученные результаты можно объяснить лишь частично.

2. Связывание CTCF ограничено сайтами с подходящей структурой хроматина/модификациями гистонов и/или наличием вблизи сайтов других факторов транскрипции, облегчающих связывание CTCF [31].

Скорее всего, в ограничении связывания CTCF определенную роль играют обе причины [32].

Очевидно, что некоторые из сайтов, связывания CTCF с которыми не обнаружено в наших экспериментах по иммунопреципитации хроматина (рис. 4), могут связывать этот белок в других типах клеток и тканей. Так, фрагменты ДНК 5d1, 5d2, 10d1–10d3, не связывающие CTCF в клетках HD3 и DT40 (рис. 4), делают это в эритроблестах эмбрионов кур [9].

Особняком стоит фрагмент 5d3, связывающийся с CTCF согласно результатам иммунопреципитации хроматина (рис. 4) и данным работы [9], но не совпадающий ни с одним из отобранных участков. Аналогично проявляет себя CTCF-связывающий фрагмент M9 [7], однако его присутствие в библиотеке подтверждается ПЦР (рис. 1B). Возможно, оба эти фрагмента ДНК не попали в число секвенированных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных экспериментов можно заключить, что эффективность связывания последовательности с СТСФ в условиях EMSA (*in vitro*) и степень ее занятости белком СТСФ связаны, по данным ChIP, односторонне – взаимодействие СТСФ с участком ДНК *in vitro* по большей части не означает, что этот участок будет занят СТСФ в ядре клетки. Связывание же СТСФ *in vivo*, наоборот, чаще всего сопровождается непосредственным взаимодействием белка с данным участком ДНК *in vitro*.

Кроме того, из полученных результатов видно, что при эритроидной дифференцировке не происходит существенных изменений в связывании СТСФ с исследованными фрагментами ДНК.

Единственный обнаруженный нами сайт, в высокой степени связанный с СТСФ в эритроидных клетках HD3 и HD3-ind, существенно (в 2–3 раза) слабее

связан с белком в лимфоидных клетках DT40, т.е. связывание СТСФ с этим участком обнаруживает заметную тканевую специфичность. В то же время не выявлено значительных различий в связывании СТСФ в линии клеток эритробластов HD3 и в клетках той же линии, стимулированных к эритроидной дифференцировке. ●

*Авторы благодарны Е.А. Стукачевой за антитела к тауматину.*

*Работа финансировалась программой поддержки ведущих научных школ России (проект НШ\_1674.2012.4), программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (проекты № 10-04-01365, 10-04-01472, 14-04-00010).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Разин С.В., Ульянов С.В., Юдинкова Е.С., Гушанская Е.С., Гаврилов А.А., Яровая О.В. // *Успехи биол. хим.* 2012. V. 52. P. 3–36.
2. Flint J., Tufarelli C., Peden J., Clark K., Daniels R.J., Hardison R., Miller W., Philipson S., Tan-Un K.C., McMorris T., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 371–382.
3. Razin S.V., Rynditch A., Borunova V., Ioudinkova E., Smalko V., Scherrer K. // *J. Cell Biochem.* 2004. V. 92. P. 445–457.
4. Anguita E., Johnson C.A., Wood W.G., Turner B.M., Higgs D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 12114–12119.
5. Holwerda S.J., de Laat W. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2013. V. 368. P. 20120369.
6. Nikolaev L.G., Akopov S.B., Didych D.A., Sverdlov E.D. // *Curr. Genomics.* 2009. V. 10. P. 294–302.
7. Valadez-Graham V., Razin S.V., Recillas-Targa F. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1354–1362.
8. Klochkov D., Rincon-Arango H., Ioudinkova E.S., Valadez-Graham V., Gavrilo A., Recillas-Targa F., Razin S.V. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26. P. 1589–1597.
9. Martin D., Pantoja C., Fernandez Minan A., Valdes-Quezada C., Molto E., Matesanz F., Bogdanovic O., de la Calle-Mustienes E., Dominguez O., Taher L., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 708–714.
10. Valdes-Quezada C., Arriaga-Canon C., Fonseca-Guzman Y., Guerrero G., Recillas-Targa F. // *Epigenetics.* 2013. V. 8. P. 827–838.
11. Chernov I.P., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // *Biotechniques.* 2006. V. 41. P. 91–96.
12. Vetchinova A.S., Akopov S.B., Chernov I.P., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 354. P. 85–93.
13. Beug H., von Kirchbach A., Doderlein G., Conscience J.F., Graf T. // *Cell.* 1979. V. 18. P. 375–390.
14. Nicolas R.H., Partington G., Major G.N., Smith B., Carne A.F., Huskisson N., Goodwin G. // *Cell Growth Differ.* 1991. V. 2. P. 129–135.
15. Orkin S.H., Harosi F.I., Leder P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 98–102.
16. Gavrilo A.A., Razin S.V. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 4629–4640.
17. Котова Е.С., Сорокина И.В., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Сverdlov E.D. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. С. 1122–1127.
18. Gushchanskaya E.S., Artemov A.V., Ulyanov S.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Kotova E.S., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Iarovaia O.V., Sverdlov E.D., et al. // *Epigenetics.* 2014. V. 9. P. 951–963.
19. Nikolaev L.G., Tsevegijn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1330–1336.
20. Orlando V. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. P. 99–104.
21. Ruijter J.M., Ramackers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J., Moorman A.F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. e45.
22. Kohne A.C., Baniahmad A., Renkawitz R. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 232. P. 747–755.
23. Filippova G.N., Fagerlie S., Klenova E.M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P.E., Collins S.J., Lobanenkov V.V. // *Mol. Cell Biol.* 1996. V. 16. P. 2802–2813.
24. Meyer L.R., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kuhn R.M., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. D64–D69.
25. Targa F.R., de Moura Gallo C.V., Huesca M., Scherrer K., Marcaud L. // *Gene.* 1993. V. 129. P. 229–237.
26. Arnold R., Burcin M., Kaiser B., Muller M., Renkawitz R. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2640–2647.
27. MacPherson M.J., Sadowski P.D. // *BMC Mol. Biol.* 2010. V. 11. P. 101.
28. Bell A.C., Felsenfeld G. // *Nature.* 2000. V. 405. P. 482–485.
29. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. // *Nature.* 2000. V. 405. P. 486–489.
30. Nakahashi H., Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. P. 1678–1689.
31. The ENCODE Project Consortium. // *Nature.* 2012. V. 489. P. 57–74.
32. Teif V.B., Beshnova D.A., Vainshtein Y., Marth C., Mallm J.P., Hofer T., Rippe K. // *Genome Res.* 2014. V. 24. P. 1285–1295.

УДК 577.151.45 + 571.27

# Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца на клетках различных микроорганизмов

П. А. Левашов<sup>1\*</sup>, Е. Д. Овчинникова<sup>1</sup>, О. А. Морозова<sup>2</sup>, Д. А. Матолыгина<sup>1</sup>, Е. Э. Осипова<sup>1</sup>, Т. А. Чердынцева<sup>3</sup>, С. С. Савин<sup>1</sup>, Г. С. Захарова<sup>1,4</sup>, А. А. Алексеева<sup>1,4</sup>, Н. Г. Белогурова<sup>1</sup>, С. А. Смирнов<sup>1</sup>, В. И. Тишков<sup>1,4\*</sup>, А. В. Левашов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, межклиническая бактериологическая лаборатория, 119881, Москва, Б. Пироговская, 2, стр. 4

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>4</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

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

Поступила в редакцию 01.12.2015

Принята к печати 22.01.2016

**РЕФЕРАТ** Изучена бактериолитическая активность интерлейкина-2 и лизоцима куриного яйца в отношении 34 видов микроорганизмов. Установлено, что в присутствии интерлейкина-2 лизису подвергаются шесть видов из трех семейств: Enterobacteriaceae, Bacillaceae и Lactobacillaceae. Выявлено также 12 видов микроорганизмов, подверженных лизису в присутствии лизоцима, и 16 видов, лизируемых додецилсульфатом натрия (ДСН). Исследована рН-зависимость бактериолитической активности интерлейкина-2 и лизоцима в отношении разных клеток-субстратов.

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

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДСН – додецилсульфат натрия; КОЕ – число колониеобразующих единиц.

## ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) – один из важнейших регуляторов жизнедеятельности организма. Этот лимфокин участвует в регуляции таких процессов, как пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцитов; увеличение цитолитической активности НК-клеток; пролиферация В-лимфоцитов, секреция иммуноглобулинов и др. Недавно нами было показано, что ИЛ-2 человека способен проявлять бактериолитическую активность [1–3]. В результате сравнительного тестирования на нескольких штаммах бактерий установлено, что ИЛ-2 имеет более узкую субстратную специфичность, чем лизоцим куриного яйца. ИЛ-2, как и лизоцим, способен лизировать клетки *Escherichia coli* и *Lactobacillus plantarum*, но, в отличие от лизоцима, не действует на клетки *Micrococcus luteus* и *Bacillus subtilis* [1–3]. Обнаружение активности интерлейкина-2 в отношении *E. coli* и *L. plantarum* оказалось

неожиданным. Механизм бактериолитического действия интерлейкина-2 на сегодняшний день не известен, для его выяснения необходимо изучить влияние интерлейкина-2 на другие виды бактерий. Поскольку интерлейкин-2 играет важную роль в развитии иммунного ответа, а также является лекарственным средством, то, в первую очередь, актуально проверить его действие на тех бактериях, которые часто контактируют с человеком, включая компоненты симбиотической микрофлоры. Основной задачей исследования стал скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 на микроорганизмах, которые встречаются на коже и слизистых человека, могут обнаруживаться в биоматериале раны. Для сравнения было решено на тех же микроорганизмах проверить действие лизоцима, а также изучить лизис клеток в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), который входит в состав медицинских препаратов интерлейкина-2.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие материалы: ронколейкин (раствор 0.25 мг/мл очищенного интерлейкина-2 для внутривенного и подкожного введения, «Биотех», Россия); MES, трис (“extra pure”, Amresco, США); лиофилизированный лизоцим куриного яйца (95% чистоты, Sigma Aldrich, США); NaOH (98% чистоты, AppliChem Panreac, Германия);  $\text{CH}_3\text{COOH}$  («ч. д. а.», «Реахим», Россия); HCl (Germed, Германия); 10% водный раствор ДСН (BioRad, США).

Выделенные из клинического материала (моча, мокрота, кал, раневое отделяемое и т.д.) штаммы микроорганизмов были любезно предоставлены Первым МГМУ им. И.М. Сеченова. Видовую принадлежность микроорганизмов определяли методом прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (серия FLEX, Bruker Daltonic GmbH, Германия). В качестве среды для культивирования использовали твердую агаризованную среду – 5% кровяной колумбийский агар (Oxoid, Великобритания) pH 7.3. Культуру клеток выращивали в течение 24 ч при 35°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

В работе также были использованы штаммы из музейной коллекции кафедры микробиологии МГУ им М.В. Ломоносова (обозначены как КМ МГУ). *L. acidophilus* КМ МГУ 146, *L. casei* КМ МГУ 153 и *Lactococcus lactis* КМ МГУ 165 выращивали на жидкой среде MRS при 37°C в анаэробных условиях [4]. *Clostridium butiricum* КМ МГУ 19 выращивали на среде следующего состава: глюкоза 10 г/л; пептон 10 г/л;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 г/л;  $\text{CaCO}_3$  5 г/л; вода водопроводная, при 37°C в анаэробных условиях [5]. *Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82, *B. megaterium* КМ МГУ 17, *B. mycoides* КМ МГУ 31, *B. cereus* КМ МГУ 9, *Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47, *P. fluorescens* КМ МГУ 71, *Serratia marcescens* КМ МГУ 208 и *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144 выращивали на мясо-пептонном бульоне при 30°C в аэробных условиях [6].

В работе использовали препарат лиофилизированных бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* («Микроген», Россия), из которого перед началом работы готовили суспензию (10 мл воды на одну ампулу). Предполагалось, что лиофилизированный препарат бактерий в эксперименте по измерению скорости лизиса мало отличается от свежесозревших клеток по аналогии с препаратом лиофилизированных клеток *L. plantarum* [7].

Препарат клеток *Thermus aquaticus* любезно предоставлен А.А. Белогуровым. Клетки выращивали по стандартной для данной культуры методике при температуре 75°C в аэробных условиях [8].

Перед началом измерений все препараты бактериальных клеток центрифугировали при 3500 об/мин

в течение 4 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), затем ресуспендировали в буферном растворе, используемом для измерения активности. Раствор лизоцима куриного яйца готовили непосредственно перед экспериментом, используя тот же буферный раствор, что и для измерения активности. В качестве стандартного раствора интерлейкина-2 использовали готовый препарат без дополнительной обработки, ампулу вскрывали непосредственно перед экспериментом. Поскольку в исходном растворе интерлейкина-2 присутствует ДСН (2.5 мг/мл), проведены эксперименты по влиянию данного компонента на фоновый лизис клеток. Для определения изменений поглощения при лизисе клеток использовали двухлучевые спектрофотометры UV-1800 или UV-1601PC (Shimadzu, Япония). Измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см объемом 0.5 мл.

Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по скорости падения поглощения суспензии клеток [7, 9] при длине волны 650 нм и температуре 37°C. В качестве начальной скорости лизиса клеток использовали изменение поглощения ( $A_{650}$ ) в интервале времени от 5 до 20–30 с от начала реакции. Если в условиях эксперимента наблюдался фоновый самопроизвольный лизис клеток в отсутствие бактериолитических факторов, то его величину вычитали из значения активности в присутствии бактериолитических добавок. В случае лизиса клеток в присутствии ДСН учитывали также поправку на величину скорости лизиса в присутствии интерлейкина-2 соответственно содержанию ДСН в пробе. При определении скорости лизиса использовали суспензию клеток с начальным поглощением  $A_{650} = 0.4$ . Активность измеряли в буферном растворе 10 mM MES-трис- $\text{CH}_3\text{COOH}$  при разных значениях pH. В качестве условного показателя активности приведены значения начального изменения поглощения  $-dA/dt$  (ед. погл./мин), которые (с соответствующими для различных клеток коэффициентами) пропорциональны скоростям изменения числа живых клеток или колониеобразующих единиц ( $-d\text{КОЕ}/dt$ ), соответственно пропорциональны изменениям степени лизиса  $d\Theta/dt$  ( $\Theta = 0$ , если все клетки целы, и  $\Theta = 1$  в случае 100% разрушения клеток препарата) [7, 9].

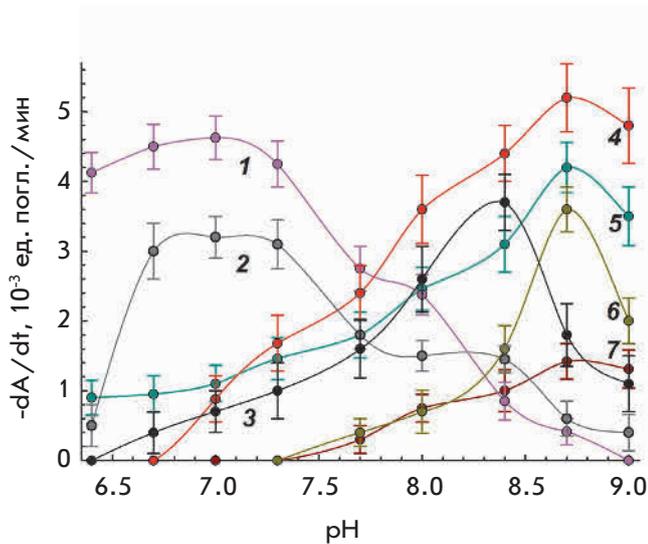
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены данные о воздействии интерлейкина-2, лизоцима и ДСН на клетки 37 штаммов 34 различных видов бактерий. Как видим, 12 видов бактерий подвержены лизису в присутствии лизоцима, 16 лизируются в присутствии ДСН и только шесть видов чувствительны к интерлейкину-2: *L. acidophilus*, *B. megaterium* (подтверж-

Лизис бактерий в присутствии интерлейкина-2, лизоцима и додецилсульфата натрия (ДСН)

№	Микроорганизм	Скорость лизиса в присутствии добавки		
		лизоцим	интерлейкин-2	ДСН
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0
2	<i>Alcaligenes faecalis</i> КМ МГУ 82	3.2/2.0/6.4	0	1.1/100/8.0
3	<i>Bacillus megaterium</i>	5.2/0.8/8.7	6.1/15/8.7	0
4	<i>Bacillus megaterium</i> КМ МГУ 17	2.2/2.0/8.5	2.6/30/8.5	0
5	<i>Bacillus mycoides</i> КМ МГУ 31	4.5/4.0/8.0	3.6/10/8.0	0.7/100/8.0
6	<i>Bacillus cereus</i> КМ МГУ 9	4.5/4.0/8.5	0.9/30/8.5	0
7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0	0	0
8	<i>Citrobacter braakii</i>	0	0	0
9	<i>Clostridium butyricum</i> КМ МГУ 19	0	0	2.5/400/8.0
10	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	0	0	0
11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	7.8/2.0/6.4	0
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0.9/200/8.0
13	<i>Enterobacter faecalis</i>	0	0	1.9/50/8.0
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	3.2/0.8/7.0	2.9/5.0/7.0	2.4/50/8.0
16	<i>Lactobacillus casei</i> КМ МГУ 153	0	0	0
17	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 165	0	0	0
18	<i>Morganella morganii</i>	0	0	2.0/40/8.0
19	<i>Neisseria perflava</i>	0	0	0
20	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	2.9/50/8.0
21	<i>Proteus vulgaris</i>	3.6/2.0/8.7	0	2.2/60/8.0
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.2/0.2/8.7	0	5.8/50/8.0
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КМ МГУ 47	7.3/0.4/7.7	0	1.1/100/8.0
24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> КМ МГУ 71	3.5/0.5/8.4	0	0
25	<i>P. putida</i>	0	0	2.5/200/8.0
26	<i>Rothia mucilaginosa</i>	0	0	0
27	<i>Serratia marcescens</i> КМ МГУ 208	3.7/0.2/8.4	4.7/30/8.0	0
28	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	6.2/50/8.0
29	<i>Staphylococcus aureus</i> КМ МГУ 144	1.6/1.0/7.7	0	0
30	<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0	0
31	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0
32	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.4/0.4/8.7	0	4.9/20/8.0
33	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0
34	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	3.3/150/8.0
35	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4.6/5.0/7.0	0	4.1/50/8.0
36	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	0
37	<i>Thermus aquaticus</i>	0	0	3.6/125/8.

Примечание. Значения скоростей лизиса даны в виде X/Y/Z, где X – скорость лизиса, ед. погл.,  $10^{-3} \times \text{мин}^{-1}$ , Y – концентрация добавки, мкг  $\times \text{мл}^{-1}$  и Z – pH среды, при котором проводили измерения. Для лизоцима и интерлейкина-2 даны оптимальные значения pH, для ДСН все значения скорости получены при pH 8.0. Нули означают, что вплоть до концентраций лизоцима 5 мкг/мл, интерлейкина-2 – 50 мкг/мл и для ДСН – 0.5 мг/мл не наблюдалось изменений поглощения в течение 3 мин.



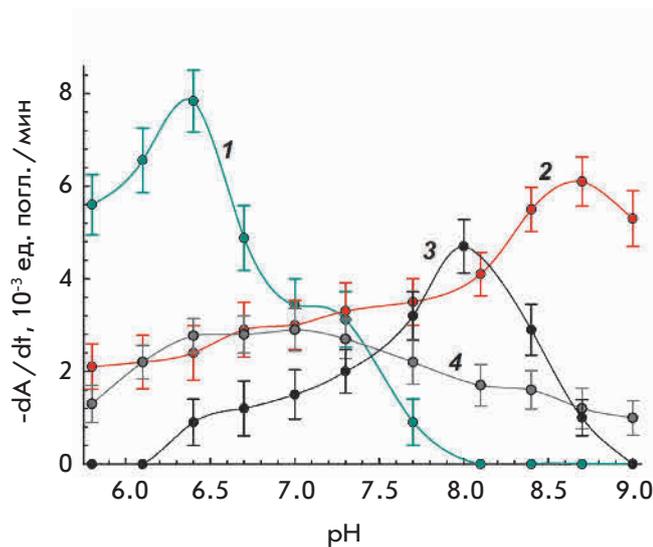
**Рис. 1.** Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии лизоцима. 1 – *Streptococcus agalactiae*, лизоцим 5.0 мкг /мл. 2 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, лизоцим 0.8 мкг /мл. 3 – *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, лизоцим 0.2 мкг /мл. 4 – *Bacillus megaterium*, лизоцим 0.8 мкг /мл. 5 – *Pseudomonas aeruginosa*, лизоцим 0.2 мкг /мл. 6 – *Proteus vulgaris*, лизоцим 2.0 мкг /мл. 7 – *Staphylococcus haemolyticus*, лизоцим 0.4 мкг /мл

дено для двух штаммов данного вида), *B. mycoides*, *B. cereus*, *S. marcescens* и *Enterobacter aerogenes*. При этом на клетки *L. acidophilus* и *B. mycoides* действуют и лизоцим, и интерлейкин-2, и ДСН. На клетки *B. megaterium*, *B. cereus* и *S. marcescens* действуют лизоцим и интерлейкин-2, но не ДСН. На *Ent. aerogenes* действует только интерлейкин-2. В целом, спектры микроорганизмов, на которые действует лизоцим и интерлейкин-2, не совпадают, хоть и имеют пересечение. Вероятно, механизм действия лизоцима и интерлейкина-2 в значительной степени различается.

На рис. 1 и 2 представлены рН-зависимости скорости лизиса клеток лизоцимом и интерлейкином-2. Видно, что значения рН-оптимума активности интерлейкина-2 и лизоцима в отношении клеток *B. megaterium* совпадают и составляют 8.7. В случае клеток *L. acidophilus* рН-оптимумы активности лизоцима и интерлейкина-2 также сходны (6.5–7.0 и 6.7–7.3). Оптимумы активности лизоцима и интерлейкина-2 близки и в случае *B. mycoides*, и *B. cereus* (на графиках зависимости не представлены из-за сходства с зависимостями для *B. megaterium*). Явление схожего смещения оптимумов активности лизоцима и интерлейкина-2, зависящего от выбора субстрата – вида бактерий, наблюдали также в случае клеток *E. coli* и *L. plantarum* [3].

На рис. 3 представлена рН-зависимость скорости лизиса клеток в присутствии ДСН. На графике приведены данные только для пяти из 16 микроорганизмов, чувствительных к ДСН. У остальных 11 микроорганизмов зависимости скорости лизиса от рН в присутствии ДСН имеют аналогичный вид. Как видим, ДСН лучше действует на клетки в щелочной среде, что присуще самым различным микроорганизмам. Действие ДСН обнаруживается при рН выше 7.3–8.0. Возможно, что подобный характер рН-зависимости каким-то образом связан с диапазоном значений рК фосфатных групп фосфолипидов клеточных мембран. Вполне вероятно также, что на характер рН-зависимости могут влиять и компоненты буферной смеси, например, трис. Выяснение точной молекулярной причины подобной зависимости действия ДСН от рН выходит за рамки нашей работы.

Интерлейкин-2 действует на отдельных представителях грамтрицательного семейства Enterobacteriaceae, в том числе на *Ent. aerogenes* и *S. marcescens*, что показано в нашей работе, а также, как установлено ранее, на *E. coli* [1–3]. Интерлейкин-2 активен в отношении таких грамположительных представителей семейства Lactobacillaceae, как *L. acidophilus* (данная работа) и *L. plantarum* [3]. Обнаружено также, что интерлейкин-2 действует на *B. megaterium*, *B. mycoides*



**Рис. 2.** Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии интерлейкина-2. 1 – *Enterobacter aerogenes*, интерлейкин-2 2.0 мкг /мл. 2 – *Bacillus megaterium*, интерлейкин-2 15 мкг /мл. 3 – *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, интерлейкин-2 30 мкг /мл. 4 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, интерлейкин-2 5.0 мкг /мл

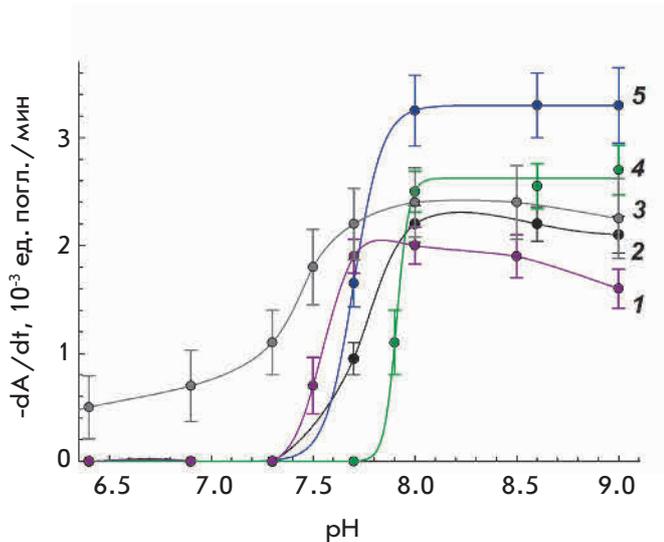


Рис. 3. Зависимость скорости лизиса клеток от pH в присутствии ДСН. 1 – *Morganella morganii*, ДСН 40 мкг/мл. 2 – *Proteus vulgaris*, ДСН 60 мкг/мл. 3 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, ДСН 50 мкг/мл. 4 – *Pseudomonas putida*, ДСН 0.2 мг/мл. 5 – *Stenotrophomonas maltophilia* ДСН 0.15 мг/мл

и *V. cereus* – грамположительные спорообразующие палочки семейства Bacillaceae, которые отличаются по строению и составу клеточной стенки как от бактерий семейства Enterobacteriaceae, так и от Lactobacillaceae. Можно предположить, что в клеточной стенке *E. coli*, *Ent. aerogenes*, *S. marcescens*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *B. mycoides*, *V. megaterium* и *V. cereus* есть некие схожие структуры. Действительно, в клеточной стенке *V. megaterium*, *V. cereus* и *L. plantarum* обнаружены структуры, содержащие диаминопимелиновую кислоту [10–13], что не характерно для многих грамположительных микроорганизмов, но достаточно распространено у представителей семейства Enterobacteriaceae [13, 14]. Считается, что клеточная стенка *L. acidophilus* не содержит значительных количеств диаминопимелиновой кислоты [15]. Однако по аналогии с *L. plantarum* мы можем предположить, что диаминопимелиновая кислота может входить в состав клеточной стенки отдельных штаммов *L. acidophilus*. Нами не обнаружены публикации, в которых приведены точные данные о присутствии и количестве диаминопимелиновой кислоты у *B. mycoides*, однако мы можем предполагать, что строение клеточной стенки у этой бактерии

и у *V. megaterium* и *V. cereus* может быть частично схожим. По-видимому, сходную восприимчивость к интерлейкину-2 у столь неродственных микроорганизмов можно объяснить наличием общих структур, содержащих диаминопимелиновую кислоту. Ранее мы показали, что интерлейкин-2 не действует на клетки *B. subtilis* [1, 2], которые также входят в семейство Bacillaceae. Однако опубликованы сведения, согласно которым у *B. subtilis*, в отличие от многих других представителей этого семейства, диаминопимелиновая кислота находится в амидированной форме [16]. Таким образом, устойчивость *B. subtilis* к действию интерлейкина-2 фактически подтверждает нашу гипотезу. В целом, на данном этапе исследования преждевременно делать точные выводы о том, какие типы микроорганизмов чувствительны к интерлейкину-2. Кроме того, чувствительность к бактериолитическим агентам может изменяться в зависимости от наличия и состава капсулы у бактерии, а также различаться даже у разных штаммов одного и того же вида [17]. Следует отметить, что продолжают дискуссии относительно механизмов действия даже давно изучаемого лизоцима на различные микроорганизмы. Есть основания полагать, что лизоцим может действовать на бактериальные клетки не только как фермент, но и как антибактериальный катионный белок [18]. В результате нашей работы установлен некий спектр микроорганизмов, чувствительных к интерлейкину-2, что поможет дальнейшему изучению молекулярных механизмов восприимчивости или невосприимчивости микроорганизмов к данному бактериолитическому фактору. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам Межклинической бактериологической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за предоставленную возможность культивирования микроорганизмов и определения их видовой принадлежности. Авторы также выражают благодарность сотрудникам кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за предоставленную возможность работы с микроорганизмами музейной коллекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1567–1570.
2. Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 3. С. 315–323.
3. Левашов П.А., Матоглыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 359–364.
4. de Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bacteriol. 1960. V. 23. P. 130–135.
5. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов. СПб.: Проспект науки, 2006. 304 с.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
7. Матоглыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 365–371.
8. Brock T.D., Edwards M.R. // J. Bacteriol. 1970. V. 104. P. 509–517.
9. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 2161–2163.
10. Bricas E., Ghuysen J.-M., Dezelée P. // Biochemistry. 1967. V. 6. № 8. P. 2598–2607.
11. Okada S., Suzuki Y., Kozaki M. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1979. V. 25. P. 215–221.
12. van Heijenoort J., Elbaz L., Dezelee P., Petit J.F., Bricas E., Ghuysen J.M. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 1. P. 207–213.
13. Day A., White P.J. // Biochem J. 1977. V. 161. № 3. P. 677–685.
14. Berges D.A., DeWolf W.E. Jr., Dunn G.L., Grappel S.F., Newman D.J., Taggart J.J., Gilvarg C. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. № 1. P. 89–95.
15. Ikawa M., Snell E.E. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. P. 1376–1382.
16. Warth A.D., Strominger J.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1969. V. 64. № 2. P. 528–535.
17. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompert C.M., Albertí S., Bengoechea J.A. // Infection Immunity. 2004. V. 72. № 12. P. 7107–7114.
18. Ginsburg A., Koren E., Feuerstein O. // SOJ Microbiol. Infect. Dis. 2015. V. 3. № 1. P. 1–8.

УДК 577.15:544.3

# Термодинамика конформационных переходов AP-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК

А. Д. Мирошникова<sup>1</sup>, А. А. Кузнецова<sup>1</sup>, Н. А. Кузнецов<sup>1,2\*</sup>, О. С. Федорова<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 01.07.2015

Принята к печати 12.11.2015

**РЕФЕРАТ** Одной из актуальных задач в изучении репарации ДНК остается выяснение механизма ферментативного процесса с участием эндонуклеазы APE1, который обеспечивает высокоточное узнавание апуриновых/апиримидиновых (AP) сайтов в ДНК и эффективный гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи, играя тем самым важную роль в обеспечении стабильного функционирования ДНК и жизнедеятельности клетки. В настоящей работе проведен термодинамический анализ взаимодействия APE1 с ДНК-субстратом, содержащим аналог AP-сайта, у которого отсутствует ОН-группа в положении С1' 2'-дезоксирибозы (F-сайт). Методом «остановленного потока» с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции белка при разных температурах проведен анализ кинетики образования фермент-субстратных комплексов, каталитической стадии и диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Рассчитаны изменения стандартной свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии последовательных стадий ферментативного процесса, а также образования переходного состояния в каталитической стадии. Полученные данные позволили предположить, что на первой стадии процесса происходят образование контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-субстратом, встраивание остатков Arg177 и Met270 в большую и малую бороздки ДНК соответственно и вытеснение из бороздок «кристаллической» воды. На второй стадии происходят выворачивание F-сайта в активный центр фермента и образование специфических контактов с 2'-дезоксирибозой и 5'-фосфатной группой. Показано, что основной вклад в термодинамические параметры процесса диссоциации комплекса фермент-продукт вносят неспецифические взаимодействия между ДНК-связывающим центром и рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** апуриновый/апиримидиновый сайт, AP-эндонуклеаза человека, кинетический механизм, предстационарная кинетика, термодинамика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; APE1 – AP-эндонуклеаза человека; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; F-сайт – остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана.

## ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК являются апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты) [1, 2], которые образуются в ДНК при спонтанном или катализируемом ДНК-гликозилазами гидролизе N-гликозидных связей [3]. Ежедневно в каждой клетке организма человека может возникать до 10 000 AP-сайтов. Высокая мутагенность AP-сайтов связана как с отсутствием кодирующего азотистого основания, так и с их повышенной способностью вызывать одноцепочечные разрывы рибозофосфатного остова ДНК.

Ключевой фермент системы эксцизионной репарации оснований (ЭРО) – апуриновая/апиримиди-

новая эндонуклеаза человека APE1 – отвечает за поиск и иницирование процесса удаления AP-сайтов из ДНК [4, 5]. Основной физиологической функцией фермента является гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК с 5'-стороны от AP-сайта, в результате чего происходит разрыв рибозофосфатного остова с образованием фрагментов цепи, содержащих 3'-гидроксильную группу и 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат [6, 7].

Анализ кристаллических структур свободного фермента APE1 [8–10] и его ковалентных комплексов с ДНК [11–13] показал, что для осуществления катализа в комплексе APE1 · ДНК образуются контакты, которые приводят к выворачиванию AP-сайта из двойной спирали. На *рис. 1* представлена

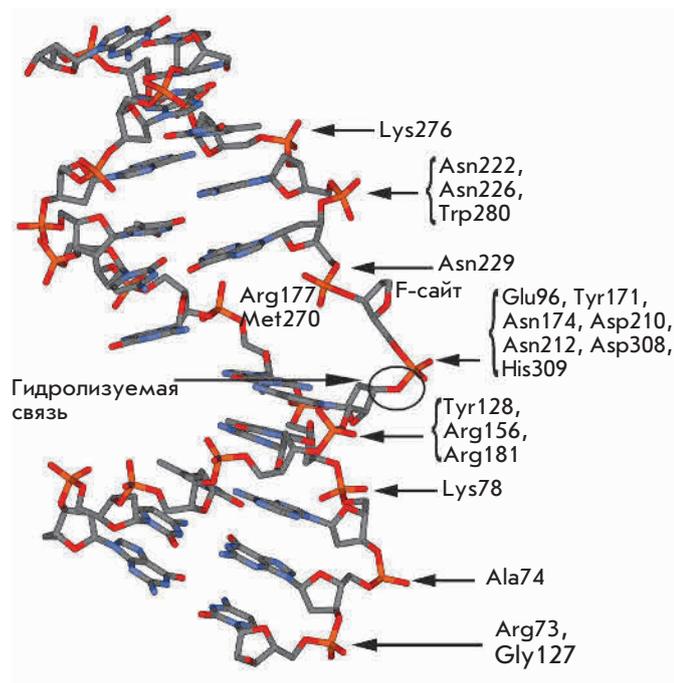
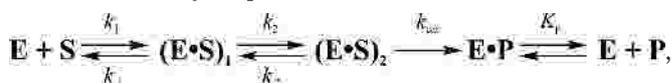


Рис. 1. Схема контактов, образующихся в фермент-субстратном комплексе APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8 [11])

схема контактов в фермент-субстратном комплексе APE1 с ДНК, содержащей F-сайт, у которого отсутствует OH-группа в положении C1' дезоксирибозы (PDB ID 1DE8). Видно, что аминокислотные остатки фермента взаимодействуют преимущественно с одной цепью дуплекса, как правило, с образованием водородных связей и электростатических контактов между фосфатными группами ДНК и боковыми радикалами аминокислот, а также с амидными группами пептидных связей белка. Активный центр фермента образован остатками Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212 и Asn174. Стабилизация внеспиральной конформации AP-сайта осуществляется остатками Met270 и Arg177. Met270 встраивается в малую бороздку ДНК, тем самым вытесняя основание, расположенное напротив AP-сайта. Остаток Arg177 встраивается со стороны большой бороздки ДНК и образует водородную связь с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от AP-сайта. В фермент-субстратном комплексе, находящемся в каталитически компетентном состоянии, остаток фосфата, расположенный с 5'-стороны от AP-сайта, координирован остатками Asn174, Asn212 и His309. Каталитическая реакция начинается с нуклеофильной атаки молекулы воды, координированной прямо или опосредованно через ион  $Mg^{2+}$  остатком Asp210 [11, 13], по 5'-фосфатной группе.

Ранее методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана [14, 15], входящих в состав фермента, и 2-аминопурина [16], расположенного с 3'- или 5'-стороны от AP-сайта, был установлен кинетический механизм взаимодействия APE1 с ДНК-субстратами (схема). В качестве субстратов использовали ДНК-дуплексы, содержащие нативный AP-сайт или его аналог (F-сайт) без OH-группы в положении C1' дезоксирибозы. Показано, что взаимодействие APE1 с субстратами включает, как минимум, две стадии связывания ДНК и узнавания AP-сайта, которые приводят к образованию каталитически компетентного комплекса. В этом комплексе происходит необратимая стадия каталитического гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи AP-сайта. Последняя стадия кинетического механизма характеризует равновесный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Схема. Кинетический механизм взаимодействия APE1 с ДНК-субстратом



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

Следует отметить, что согласно рентгеноструктурным данным связывание ДНК приводит лишь к незначительным структурным перестройкам APE1 (рис. 2). Сравнение структуры свободного APE1 (PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8), показывает, что один из семи остатков триптофана молекулы фермента, Trp280, расположен в ДНК-связывающем центре фермента и образует водородную связь с фосфатной группой ДНК. Таким образом, наблюдаемые изменения флуоресценции Trp, скорее всего, характеризуют конформационные изменения фермента в области Trp280.

Цель нашей работы состояла в определении термодинамических параметров конформационных перестроек APE1 при специфическом узнавании поврежденного участка ДНК и осуществлении каталитической стадии ферментативной реакции в условиях эксцизионной репарации оснований с использованием кинетических данных ферментативного процесса, полученных для различных температур. Использованный подход позволил определить термодинамические параметры стадий образования каталитически активной формы фермента, включая

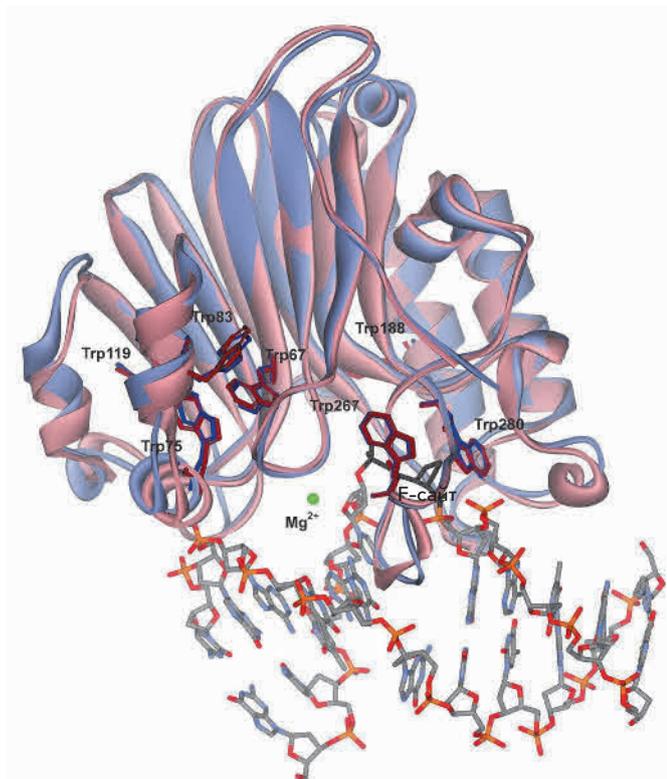


Рис. 2. Сравнение структуры свободного APE1 (розовый, PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (фиолетовый, PDB ID 1DE8)

промежуточный фермент-субстратный комплекс, в отличие от данных [17], полученных ранее для неактивной формы APE1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company  $3.9 \times 300$  mm particle size 12–30  $\mu\text{m}$ ) и последующей обращенно-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100-20 C<sub>18</sub> 10  $\times$  250 mm, Macherey-Nagel, Германия). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрацию олигонуклеотидов измеряли по оптической плотности растворов на длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и рассчитывали по закону Бугера–Ламберта–Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции, определенных в приближении метода «ближайших соседей» [18]. ДНК-субстрат фермента APE1 (F-субстрат) представлял собой 17-звенный дуплекс, состоящий из дезоксирибоолигонуклеотидов

5'-TCTCTCTCFCCTTCCTT-3' и  
3'-AGAGAGAGGGGAAGGAA-5'.

### Фермент APE1

Фермент APE1 был выделен из линии клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET11a, несущей ген AP-эндонуклеазы человека. Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозидом до 0.2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащего 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френч-пресса. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащим 40 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок APE1, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin<sup>TM</sup>, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в буферном растворе I и линейном градиенте 40  $\rightarrow$  600 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Степень чистоты белка APE1 определяли с помощью гелеэлектрофореза. Фракции, содержащие белок APE1, диализовали в буфере 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при -20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значений оптической плотности белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 56818 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [19].

### Кинетические исследования методом «остановленного потока»

Кинетические кривые флуоресценции регистрировали с использованием спектрометра остановленной струи SX.20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 290 нм. Флуоресценцию регистрировали на длинах волн более 320 нм (Schott filter WG 320). Поскольку молекула APE1 содержит семь остатков Trp и 11 остатков Trp, то в использованных условиях регистрации интенсивность флуоресценции белка более чем на 90% определялась остатками Trp. «Мертвое» время прибора составляло 1.1 мс, максимальное время регистрации сигнала равно 200 с. Все экспе-

рименты выполняли в буферном растворе, соответствующем условиям ЭРО: 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 7% глицерин при 10–37°C. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по трем экспериментальным кривым.

### Анализ степени гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в AP-сайте

Для получения зависимостей степени гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в AP-сайте от времени смешивали растворы фермента и меченого <sup>32</sup>P субстрата. Метку вводили по 5'-концу F-содержащего олигонуклеотида с помощью T4-полинуклеотидкиназы («СибЭнзим», Новосибирск) и [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР («Биосан», Новосибирск) согласно [20, 21]. Далее из реакционной смеси отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 3 мкл раствора 7 М мочевины, 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола FF. Электрофорез в ПААГ проводили при напряжении 50 В/см. Гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку Agfa CP-BU New (Agfa-Geveart, Бельгия) в течение 12–60 ч при –20°C.

### Анализ кинетических кривых

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций субстрата при разных температурах. Регистрацию проводили в условиях, близких к «одному обороту фермента», т.е. при концентрациях фермента и субстрата одного порядка. Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратом, и расчета констант скорости всех элементарных стадий данной схемы использовали программу DynaFit (BioKin, США) [22]. Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [23–25].

Используя полученные значения констант скорости отдельных стадий, рассчитывали константы равновесия ( $K_i$ ) этих стадий ( $k_i/k_{-i}$ , где  $i$  – номер стадии) при разных температурах. Стандартные термодинамические параметры  $i$ -й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант-Гоффа (1) [26, 27]

$$\ln(K_i) = -\Delta G_i/RT = -\Delta H_i/RT + \Delta S_i/R. \quad (1)$$

Зависимости  $\ln(K_i)$  от  $1/T$  имели линейный вид.

Анализ температурной зависимости константы скорости химической реакции  $k_{cat}$  по уравнению

Эйринга (2) позволил рассчитать стандартную энтальпию активации ( $\Delta H^\ddagger$ ) и стандартную энтропию активации ( $\Delta S^\ddagger$ ) переходного состояния [26]

$$\ln(k_{cat}/T) = \ln(k_B/h) + (\Delta S^{o,\ddagger}/R) - (\Delta H^{o,\ddagger}/RT), \quad (2)$$

где  $k_B$  и  $h$  – постоянные Больцмана и Планка соответственно,  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура в градусах Кельвина.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для уточнения природы процессов, происходящих на последовательных стадиях узнавания F-сайта в ДНК-субстрате, катализа и диссоциации комплекса фермента с продуктом, был выполнен постадийный термодинамический анализ взаимодействия APЕ1 с F-субстратом. Методом «остановленного потока» с регистрацией интенсивности флуоресценции остатков Trp в APЕ1 получены кинетические кривые, характеризующие взаимодействие APЕ1 с 17-звенным F-субстратом в условиях одного оборота фермента при температуре от 10 до 37°C (рис. 3). Видно, что взаимодействие APЕ1 с F-субстратом приводит к многофазным изменениям интенсивности флуоресценции Trp. Согласно полученным ранее данным [14, 15], уменьшение интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетических кривых характеризует образование каталитически компетентного комплекса. Каталитическая стадия процесса, приводящая к образованию продуктов и последующей диссоциации комплекса фермент–продукт, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции Trp на более поздних временах (начиная примерно от 1 с). Как видно из кинетических кривых (рис. 4), обе фазы изменения интенсивности флуоресценции зависят от температуры.

Анализ кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции белка показал, что минимальный кинетический механизм взаимодействия APЕ1 с ДНК-субстратом, содержащим в качестве повреждения F-сайт, включает двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент–продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса, который, как и ранее [14–16], описывается схемой.

Константы скорости прямых и обратных реакций, характеризующие взаимодействие APЕ1 с ДНК-субстратом при разных температурах, рассчитывали методом нелинейной регрессии, включающим численное интегрирование дифференциальных уравнений, соответствующих схеме, как описано ранее [28, 29]. Используя полученные константы скорости, определяли константы равновесия  $K_i$  и  $K_p$  (табл. 1).

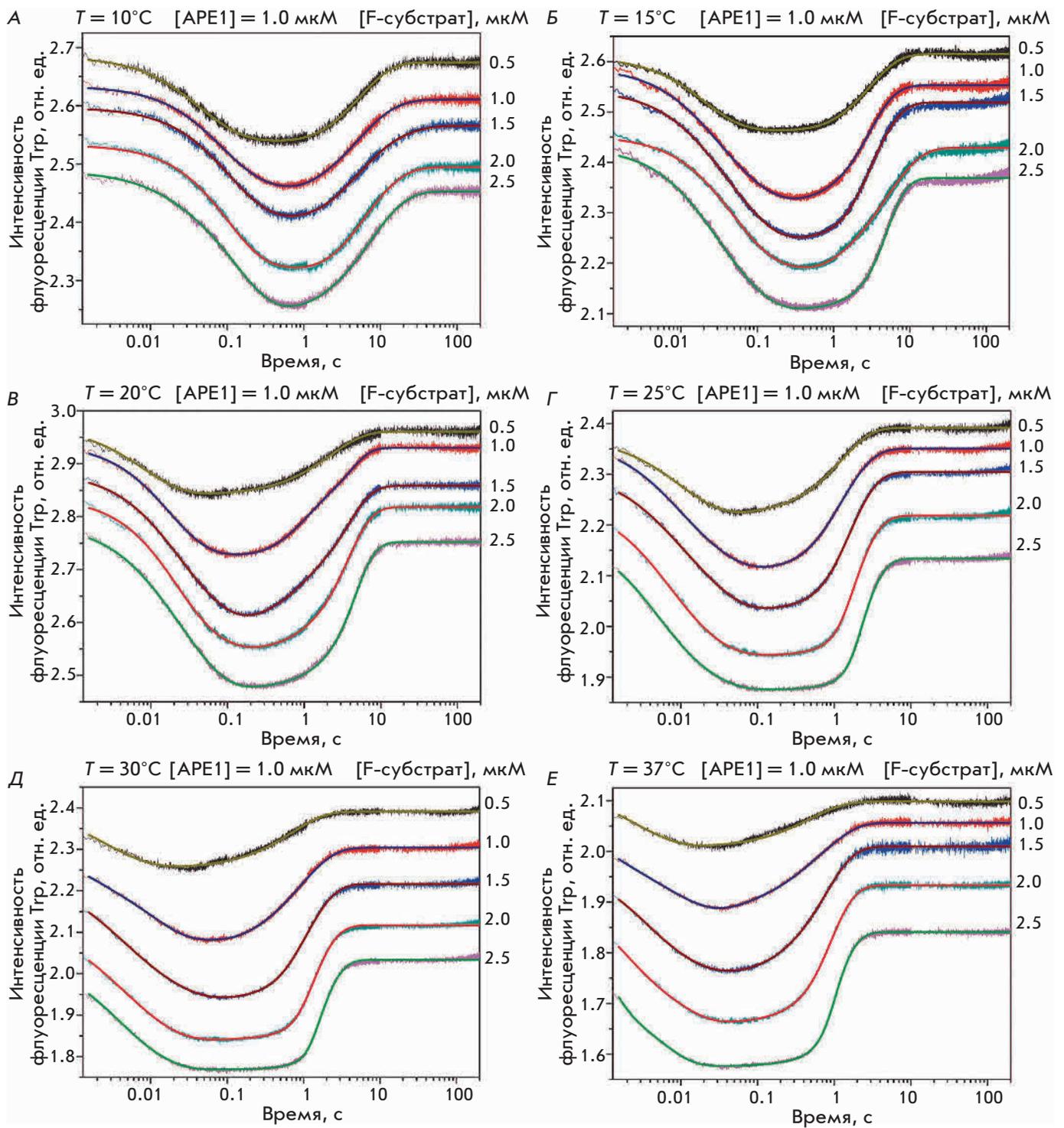


Рис. 3. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения APE1 при взаимодействии с F-субстратом при 10°C (А), 15°C (Б), 20°C (В), 25°C (Г), 30°C (Д) и 37°C (Е), и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме. [APE1] = 1.0 мкМ, концентрация F-субстрата варьирует в диапазоне от 0.5 до 2.5 мкМ

Таблица 1. Константы скорости отдельных стадий взаимодействия APE1 с F-субстратом в условиях ЭРО и константы диссоциации комплекса фермент–продукт

Температура	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
Константа						
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(5.1 \pm 2.1) \times 10^6$	$(16.0 \pm 3.4) \times 10^6$	$(46.0 \pm 12.0) \times 10^6$	$(100 \pm 12) \times 10^6$	$(190 \pm 32) \times 10^6$	$(520 \pm 20) \times 10^6$
$k_{-1}, c^{-1}$	$3.3 \pm 0.4$	$7.3 \pm 3.6$	$12.0 \pm 5.1$	$11.0 \pm 2.5$	$19.0 \pm 5.2$	$47.0 \pm 13.0$
$K_1^*, M$	$0.65 \times 10^{-6}$	$0.47 \times 10^{-6}$	$0.26 \times 10^{-6}$	$0.11 \times 10^{-6}$	$0.10 \times 10^{-6}$	$0.09 \times 10^{-6}$
$k_2, c^{-1}$	$4.2 \pm 2.6$	$3.7 \pm 1.2$	$8.2 \pm 3.9$	$8.8 \pm 4.4$	$15.0 \pm 1.8$	$24.0 \pm 9.0$
$k_{-2}, c^{-1}$	$5.7 \pm 1.9$	$5.5 \pm 2.9$	$19.0 \pm 3.7$	$27.0 \pm 4.2$	$40.0 \pm 6.6$	$93.0 \pm 17.4$
$K_2$	1.27	0.51	0.68	0.81	0.79	0.52
$k_{cat}, c^{-1}$	$1.4 \pm 0.6$	$2.0 \pm 0.7$	$2.5 \pm 1.2$	$4.6 \pm 2.2$	$6.6 \pm 2.2$	$9.2 \pm 1.0$
$K_p, M$	$(13.5 \pm 3.9) \times 10^{-6}$	$(10.6 \pm 1.9) \times 10^{-6}$	$(7.2 \pm 1.8) \times 10^{-6}$	$(6.6 \pm 2.3) \times 10^{-6}$	$(6.9 \pm 1.2) \times 10^{-6}$	$(4.2 \pm 0.6) \times 10^{-6}$

\*Константы равновесия для стадий связывания рассчитаны по формуле  $K_i = k_{-i}/k_i$ .

Таблица 2. Термодинамические параметры взаимодействия APE1 с F-субстратом

Стадия (номер)	Параметр	$\Delta G_{i,298}^\circ$ , ккал/моль	$\Delta H_{i,298}^\circ$ , ккал/моль	$\Delta S_{i,298}^\circ$ , кал/(моль × К)
Первичное связывание ДНК (1)		-9.2	$14.3 \pm 2.2$	$79.0 \pm 7.6$
Специфическое узнавание F-сайта (2)		0.5	$-6.8 \pm 1.2$	$-24.6 \pm 4.0$
Суммарное значение параметров для стадий связывания $\sum_{i=1}^{i=2}$		-8.7	$7.5 \pm 3.4$	$54.4 \pm 11.7$
Переходное состояние каталитической стадии (3)		16.6	$12.2 \pm 0.8$	$-14.8 \pm 2.8$
Образование комплекса фермент–продукт (4)		-7.0	$6.8 \pm 1.0$	$46.6 \pm 3.5$

Как показано на рис. 5, зависимости  $\ln(K_i)$  и  $\ln(k_{cat}/T)$  от  $1/T$  имеют линейный вид, что позволяет рассчитать термодинамические параметры равновесных стадий по уравнению Вант-Гоффа (1) и параметры переходного состояния каталитической стадии по уравнению Эйринга (2) (табл. 2).

Согласно полученным данным, образование первичного фермент-субстратного комплекса (первая стадия в схеме) характеризуется положительным значением стандартной энтальпии (14.3 ккал/моль) и положительным значением энтропии (79.0 кал/(моль × К)). Известно, что увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК, как правило, обусловлено двумя факторами: десольватацией полярных групп в области контакта белок–ДНК [30] и вытеснением высокоупорядоченных «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК [31]. Можно предположить, что на этой стадии происходит образование связей между аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра и ДНК-дуплексом. Среди них можно отметить взаимодействие между фосфатными группами ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и остатками Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229 (рис. 1). Кроме того, в этот момент времени, вероятно, происходят встраивание остатка Arg177 в ДНК-

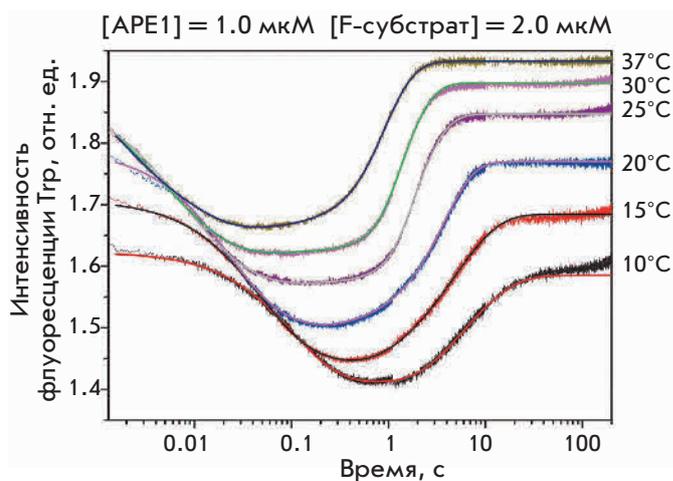


Рис. 4. Изменения интенсивности флуоресценции Trp в процессе взаимодействия APE1 и F-субстрата при различных температурах. [APE1] = 1.0 мкМ, [ДНК] = 2.0 мкМ

дуплекс со стороны большой бороздки и образование водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта. Остаток Met270 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки и также может вытеснить «кристаллическую» воду.

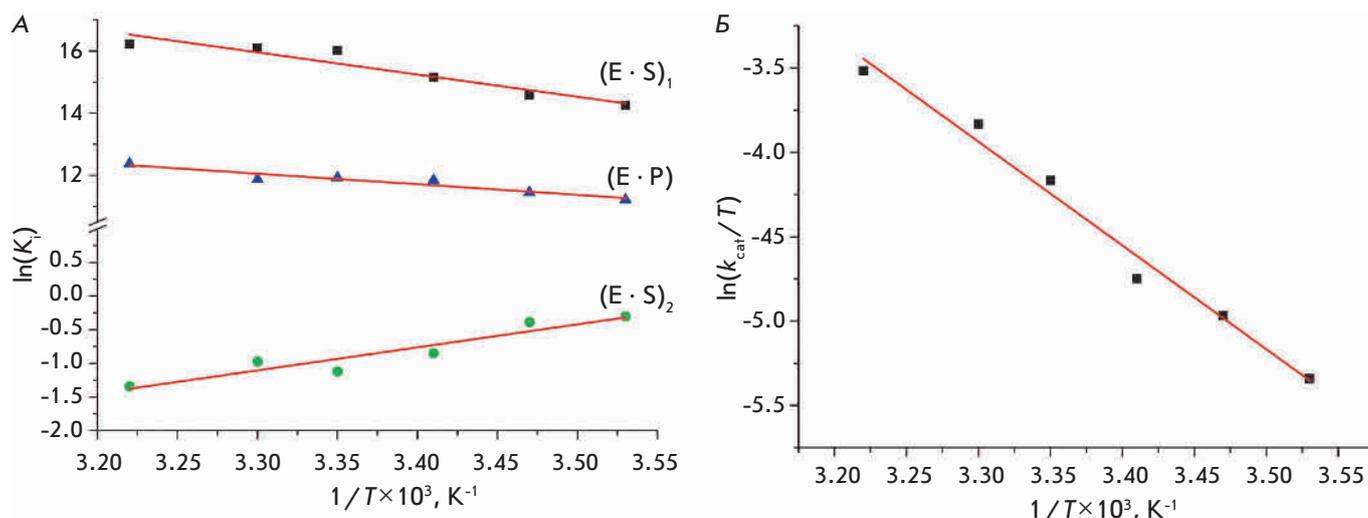


Рис. 5. Зависимости  $\ln(K_i)$  (A) и  $\ln(k_{cat}/T)$  (B) от  $1/T$

Ранее, на примере ДНК-гликозилаз Fpg *E. coli* [28] и hOGG1 человека [29], принадлежащих к разным структурным классам и, как следствие, образующих с ДНК отличающиеся по своей природе контакты, было показано, что стадии образования фермент-субстратного комплекса и его изомеризации в каталитически компетентное состояние характеризуются значительным ростом энтропии, также, по-видимому, вызванному десольватацией взаимодействующих поверхностей белка и ДНК.

Вторая стадия взаимодействия APE1 с F-субстратом, представляющая собой специфическую перегруппировку комплекса  $(E \cdot S)_1$ , характеризуется отрицательным значением изменения как энтальпии ( $\Delta H_2^\circ = -6.8$  ккал/моль), так и энтропии ( $-24.6$  ккал/(моль $\times$ K)). Отрицательное значение  $\Delta H_2^\circ$  свидетельствует о стабилизации комплекса при образовании новых, энергетически выгодных связей между взаимодействующими атомами, а отрицательное значение  $\Delta S_2^\circ$  – об увеличении его жесткости, т.е. об уменьшении внутренних степеней свободы. Эта стадия, по-видимому, включает процесс выворачивания F-сайта в активный центр фермента и стабилизации этого состояния с помощью остатков Arg177 и Met270, которые встраиваются в большую и малую бороздки ДНК соответственно. Кроме того, в этот момент происходит, вероятно, образование связей между фосфатной группой, расположенной в 5'-направлении от F-сайта (рис. 1), остатками Asn174, Asn212 и His309 и ионом  $Mg^{2+}$ , расположенными в активном центре фермента.

Для третьей, каталитической, стадии были рассчитаны значения энтальпии ( $\Delta H^\circ$ ) и энтропии ( $\Delta S^\circ$ ) активации процесса образования переходного комплек-

са. Полученное значение энтальпии активации равно 12.2 ккал/моль. Необходимо отметить, что это значение относится к стадии гидролиза фосфодиэфирной связи ферментом APE1 и лежит в диапазоне величин 6.0–18.6 ккал/моль, полученных ранее для каталитических стадий реакций разрыва N-гликозидной связи и  $\beta$ -элиминирования фосфатных групп, осуществляемых ДНК-гликозилазами Fpg и hOGG1 [28, 29].

Термодинамические параметры образования комплексов APE1 с AP-содержащей ДНК были определены ранее методом SPR, т.е. в гетерофазных условиях, для каталитически неактивной формы фермента в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$  [17]. Исползованный же нами подход [28, 29] позволяет получать термодинамические данные для процессов, протекающих в водном растворе, т.е. в гомофазных условиях, с участием каталитически активных форм ферментов, в том числе короткоживущих фермент-субстратных промежуточных комплексов.

Интересно отметить, что термодинамические параметры стадии образования комплекса фермента с продуктом реакции коррелируют с параметрами образования первичного комплекса. Как и первая стадия, этот процесс характеризуется положительными значениями изменений стандартных значений энтальпии и энтропии (6.8 ккал/моль и 46.6 ккал/(моль $\times$ K) соответственно). Это свидетельствует о том, что основной вклад в термодинамические параметры этой стадии вносят те же взаимодействия, которые происходят на первой стадии связывания APE1 с ДНК-субстратом – неспецифические контакты между ДНК-связывающим центром и рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса. Однако комплекс фермента с продуктом  $E \cdot P$  можно

считать истинным неспецифическим комплексом, тогда как образование первичного комплекса  $(E \cdot S)_1$  в случае короткого ДНК-субстрата включает некоторые элементы специфического узнавания F-сайта. Поэтому образование комплекса  $(E \cdot S)_1$  по сравнению с комплексом  $E \cdot P$  энергетически более выгодно ( $\Delta\Delta G^\circ_{298} = -2.2$  ккал/моль,  $\Delta\Delta H^\circ = 7.5$  ккал/моль,  $\Delta\Delta S^\circ = 32.4$  ккал/(моль $\times$ К)).

Таким образом, нами получены термодинамические параметры конформационных перестроек фермента АРЕ1 в процессе специфического узнавания поврежденного участка ДНК и осуществления ка-

талитической стадии, которые позволили сделать вывод о молекулярной природе отдельных стадий кинетического механизма, описывающего функционирование фермента. ●

*Работа поддержана ФАНО, грантом РАН 6.11 по программе «Молекулярная и клеточная биология», грантом ведущих научных школ НШ-7564.2016.4, грантами РФФИ № 16-04-00037, 15-34-20121 и 15-04-00467. Часть работы, включающая анализ экспериментальных данных, поддержана грантом РФФИ № 14-14-00063.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl T. // Nature. 1993. V. 362. P. 709–715.
- Wilson III D.M., Barsky D. // Mutat. Res. 2001. V. 485. P. 283–307.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. Washington: ASM Press, 2006.
- Mol C.D., Parikh S.S., Putnam C.D., Lo T.P., Tainer J.A. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999. V. 28. P. 101–128.
- David S.S., Williams S.D. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1221–1261.
- Demple B., Sung J.-S. // DNA Repair (Amst.). 2005. V. 4. P. 1442–1449.
- Dyrkheeva N.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // Mol. Biol. (Mosk.). 2007. V. 41. P. 450–466.
- Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., de La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 6548–6558.
- Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., 3<sup>rd</sup>, Rupp B. // J. Mol. Biol. 2001. V. 307. P. 1023–1034.
- Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 2555–2562.
- Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // Nature. 2000. V. 403. P. 451–456.
- Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. // Mutat. Res. 2000. V. 460. P. 211–229.
- Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 8445–8455.
- Timofeyeva N.A., Koval V.V., Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M.K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2009. V. 26. P. 637–652.
- Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2010. V. 49. P. 6451–6461.
- Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 1306–1321.
- Adhikari S., Uren A., Roy R. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 1334–1339.
- Fasman G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3ed. Cleveland: CRC Press, 1975.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // DNA Repair (Amst.). 2012. V. 11. P. 884–891.
- Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 11335–11343.
- Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 1029–1038.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobjev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 424–435.
- Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // Mutat. Res. 2010. V. 685. P. 3–10.
- Atkins P., Paula J., Atkins' Physical Chemistry. 8th Edition. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2006.
- Ragone R., Colonna G., Ambrosone L. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 13050–13050.
- Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. P. 7384–7392.
- Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e98495.
- Jen-Jacobson L., Engler L.E., Jacobson L.A. // Structure. 2000. V. 8. P. 1015–1023.
- Privalov P.L., Dragan A.I., Crane-Robinson C. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 2483–2491.

УДК 577.21:616.1

# Сочетания полиморфных маркеров генов белков острой фазы воспаления, хемокинов и их рецепторов как потенциальные предикторы ишемической болезни сердца

Т. Р. Насибуллин<sup>1\*</sup>, Л. Ф. Ягафарова<sup>2</sup>, И. Р. Ягафаров<sup>2</sup>, Я. Р. Тимашева<sup>1</sup>, В. В. Эрдман<sup>1</sup>, И. А. Туктарова<sup>1</sup>, О. Е. Мустафина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054, Уфа, просп. Октября, 71

<sup>2</sup>Медико-санитарная часть ОАО «Татнефть» и г. Альметьевска, 423450, Альметьевск, ул. Радищева, 67

\*E-mail: NasibullinTR@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.07.2015

Принята к печати 18.01.2016

**РЕФЕРАТ** Атеросклероз, основной фактор развития ишемической болезни сердца (ИБС), представляет собой воспалительную реакцию на повреждение эндотелиального слоя в артериальном русле. Нами проведен анализ ассоциаций с ИБС полиморфных маркеров генов, контролирующих синтез белков, участвующих в процессах адгезии и хемотаксиса иммунокомпетентных клеток: rs1024611 (-2518A>G, ген *CCL2*), rs1799864 (V64I, ген *CCR2*), rs3732378 (T280M, ген *CX3CR1*), rs1136743 (A70V, ген *SAA1*), rs1205 (2042C>T, ген *CRP*) у 217 больных ИБС и 250 человек контрольной группы. С помощью метода Монте-Карло и цепей Маркова (APSampler) выявлены сочетания аллелей/генотипов, ассоциированные как с пониженным, так и с повышенным риском ИБС. Наиболее значимыми оказались: *SAA1\*Т/Т+CRP\*C+CX3CR1\*G/A* ( $P_{\text{perm}} = 0.0056$ , OR = 0.07 95%CI 0.009–0.55), *SAA1\*Т+CRP\*Т+CCR2\*G/A+CX3CR1\*G* ( $P_{\text{perm}} = 0.0063$ , OR = 14.58 95%CI 1.88–113.04), *SAA1\*Т+CCR2\*A+CCL2\*G/G* ( $P_{\text{perm}} = 0.0351$ , OR = 10.77 95%CI 1.35–85.74).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** генетический полиморфизм, сложные признаки, APSampler.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМ – инфаркт миокарда; CRP – С-реактивный белок; SAA – сывороточный амилоид А.

## ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и основной фактор ее развития – атеросклероз – относится к наиболее частым причинам инвалидизации и смертности в большинстве развитых стран мира. Молекулярно-генетические основы наследственной предрасположенности к ИБС активно изучаются, и одним из важных направлений таких исследований является анализ ассоциаций полиморфных ДНК-маркеров с заболеванием. При этом применяется как широкомасштабный скрининг маркеров по всему геному (GWAS – genome wide association study) с помощью чипов высокой плотности, так и анализ отдельных полиморфных маркеров, расположенных в областях генов, связанных с патогенезом заболевания (гены-кандидаты). В подавляющем большинстве работ анализируется вклад отдельных полиморфных мар-

керов в формирование наследственной предрасположенности к патологии. В то же время, поскольку атеросклероз, за исключением отдельных редких моногенных вариантов, представляет собой многофакторное полигенное заболевание, в основе которого лежит система сложного взаимодействующих генетических факторов и факторов внешней среды, более перспективным представляется изучение сочетаний факторов, определяющих активность отдельных звеньев патогенеза.

Согласно современным представлениям, в основе атеросклеротического поражения сосудов лежит воспалительная реакция, развивающаяся в ответ на повреждение эндотелия в артериальном русле [1]. Воспалительный процесс на всех этапах атеросклероза сопровождается привлечением иммунных клеток, участие которых в повреждении эндотелия

включает их мобилизацию из костного мозга, адгезию, хемотаксис, трансформацию, изменение соотношения между различными подклассами лейкоцитов и т.д. Все эти процессы контролируются множеством белков – медиаторов воспаления, к числу которых относятся хемокины и белки острой фазы воспаления.

Хемокины – это группа низкомолекулярных цитокинов, основная функция которых состоит в обеспечении миграции различных клеток, содержащих рецепторы хемокинов, из кровяного русла в очаг воспаления или опухоль. Хемокин CCL2 (хемоаттрактантный белок 1 моноцитов, MCP1) и его рецептор CCR2 играют центральную роль в хемотаксисе моноцитов и инфильтрации ими стенок сосудов. Повышение экспрессии гена CCR2 на поверхности моноцитов и усиление синтеза CCL2 в условиях гиперлипидемии показаны экспериментально на мышах [2, 3]. Хемокин CX3CL1 (фракталкин) представлен в двух формах – мембраносвязанной, за счет которой CX3CL1 может обеспечивать адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов, и растворимой, выполняющей функции хемоаттрактанта [4]. CX3CL1 взаимодействует с обнаруженным на мембранах Т-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток, естественных киллеров, гладкомышечных клеток рецептором CX3CR1 и обеспечивает тем самым их миграцию, адгезию и пролиферацию [5].

C-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоид А (SAA) относятся к основным белкам острой фазы воспаления. Уровень этих белков возрастает в первые часы после повреждения в 20–100 раз, а в отдельных случаях – в 1000 раз и более, что делает эти белки универсальными маркерами острого воспалительного ответа. *In vitro* показано, что CRP способен индуцировать экспрессию молекул адгезии и хемокина CCL2 на эндотелиальных клетках [6, 7]. SAA также способствует миграции моноцитов и лимфоцитов, повышая уровень экспрессии хемокинов [8].

Цель нашей работы состояла в анализе вклада сочетаний полиморфных маркеров rs1024611 (–2518A>G, ген CCL2), rs1799864 (V64I, ген CCR2), rs3732378 (T280M, ген CX3CR1), rs1136743 (A70V, ген SAA1), rs1205 (2042C>T, ген CRP) в формирование наследственной предрасположенности к ИБС.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Группу больных составили неродственные между собой мужчины ( $N = 217$ ) с верифицированным диагнозом ИБС (165 – инфаркт миокарда, 52 – стенокардия функционального класса 3–4), наблюдавшиеся в медико-санитарной части ОАО «Татнефть» и г. Альметьевска. Атеросклероз коронарных артерий был подтвержден ангиографическим обследо-

ванием. Средний возраст больных на момент обследования составил  $53.55 \pm 5.78$  лет. В исследование не включены больные сахарным диабетом и другой эндокринной патологией. В контрольную группу вошли не состоящие в родстве мужчины ( $N = 250$ ), сопоставимые по возрасту с группой больных (средний возраст  $50.48 \pm 6.03$ ). Все представители контрольной группы по данным анамнеза, клинического обследования и электрокардиографии не имели признаков сердечно-сосудистой патологии. Все участники исследования принадлежали к этнической группе татар. Все обследуемые дали информированное согласие на проведение исследования.

Образцы ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [9]. Все полиморфные маркеры, за исключением rs1205, генотипировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей обработкой продуктов амплификации соответствующей рестриктазой. Полиморфный маркер rs1205 типировали с помощью сайт-специфичной ПЦР. Ампликоны разделяли электрофоретически в 7% полиакриламидном или 2% агарозном геле. Праймеры и рестриктазы, специфичные для каждого маркера, подбирали с помощью пакета программ DNASTar 5.05 и баз данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Нуклеотидные последовательности праймеров, рестриктазы и размеры полученных фрагментов представлены в *табл. 1*.

Частоты генотипов и аллелей полиморфных маркеров в двух группах сравнивали с использованием точного двустороннего теста Фишера. Отклонения наблюдаемых частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди–Вайнберга определяли с использованием точного теста, реализованного в программе Arlequin 3.0. Поиск сочетаний аллелей/генотипов, ассоциированных с ИБС, осуществляли в программе APSampler 3.6.1, представленной на сайте <https://code.google.com/p/arsampler>. Основной алгоритм этой программы описан в статье А.В. Фаворова и соавт. [10]. В качестве поправки на множественность сравнений использовали перестановочный тест (Permutation Test), статистически значимыми считали различия при  $P_{perm} < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа распределения частот генотипов и аллелей изученных полиморфных маркеров представлены в *табл. 2*. В контрольной группе распределение частот генотипов полиморфных маркеров соответствовало теоретически ожидаемому распределению Харди–Вайнберга. Сравнительный анализ распределения частот генотипов показал,

Таблица 1. Полиморфные маркеры, вошедшие в исследование, их локализация, нуклеотидные последовательности праймеров, рестриктазы и аллели

Ген, хромосомная локализация	Полиморфизм, локализация	Праймеры, рестриктаза	Аллель, размеры фрагментов, п.н.
<i>CCL2</i> 17q12	rs1024611 -2518A>G 5'-конец	F 5'-ctc acg cca gca ctg acc tcc-3' R 5'-agc cac aat cca gag aag gag acc-3' <i>PvuII</i>	A – 300 G – 228 и 72
<i>CCR2</i> 3p21.31	rs1799864 V64I экзон 2	F 5'-tgc ggt gtt tgt gtt gtg tgg tca-3' R 5'-aga tgg cca ggt tga gca ggt-3' <i>FokI</i>	G(V) – 282 и 74 A(I) – 198, 84 и 74
<i>CX3CR1</i> 3p21.3	rs3732378 T280M экзон 2	F 5'-gga ctg agc gcc cac aca gg-3' R 5'-agg ctg gcc ctc agt gtg act-3' <i>Alw26I</i>	A(M) – 148 G(T) – 128 и 20
<i>SAA1</i> 11p15.1	rs1136743 A70V экзон 3	F 5'-ccc ctc taa ggt gtt gtt gga-3' R 5'-ctc cac aag gag ctc gtc tc-3' <i>BshNI</i>	T(V) – 289 C(A) – 183 и 106
<i>CRP</i> 1q23.2	rs1205 2042C>T 3'-нетранслируемая область	F 5'-aga aaa cag ctt gga ctc act ca-3' R 5'-tga gag gac gtg aac ctg gg-3' C 5'-cca gtt tgg ctt ctg tcc tca c-3' T 5'-cca gtt tgg ctt ctg tcc tca t-3'	БК* – 235 Аллель – 82

\*БК – внутренний контроль, содержит тестируемую замену.

что у больных ИБС повышены частоты генотипов *CRP*\*Т/Т ( $P = 0.02$ ,  $OR = 1.74$  95%CI 1.1–2.75) и *SAA1*\*Т/С ( $P = 0.014$ ,  $OR = 1.61$  95%CI 1.11–2.34).

С помощью алгоритма APSampler выявлено 743 сочетания генотипов и аллелей, ассоциированных с ИБС, из которых после валидации результатов осталось пять сочетаний, ассоциированных с пониженным, и семь – с повышенным риском ИБС (табл. 3).

В этнически однородной группе мужчин с ИБС и в контрольной группе проанализировано распределение частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов *SAA1*, *CRP*, *CCL2*, *CCR2* и *CX3CR1*. С помощью программы APSampler выявлены сочетания полиморфных маркеров, ассоциированные с риском развития заболевания. Следует отметить, что если при сравнении распределений частот генотипов и аллелей отдельных полиморфных маркеров статистически значимые результаты получены лишь для генов *SAA1* и *CRP*, то в составе выявленных сочетаний в том или ином виде были представлены все изученные полиморфные маркеры.

Аллель *SAA1*\*Т (rs1136743) входит в состав сочетаний, ассоциированных как с повышенным, так и с пониженным риском ИБС. Известно, что в московской популяции у больных ревматоидным артритом и у больных средиземноморской лихорадкой в Турции – гомозиготных носителей гаплотипа rs1136743\*Т/rs1136747\*С, повышен риск развития амилоидоза [11, 12]. Как отмечалось ранее, *SAA* стимулирует экспрессию провоспалительных хемокинов

[8]. Кроме того, *SAA* способен замещать аполипопротеин А в липопротеинах высокой плотности (ЛПВП), что приводит к утрате ими антиатерогенных свойств и превращению их в проатерогенные [13]. В то же время есть данные и об антиатерогенных свойствах *SAA*. В частности, *SAA* ингибирует активацию тромбоцитов и предотвращает их агрегацию в местах повреждения эндотелия [14], а также способствует удалению ЛПВП из клетки [15].

Согласно результатам мультицентрового исследования, в котором участвовали перенесшие инфаркт миокарда (ИМ) жители шести городов Европы, больные с генотипом *CRP*\*Т/Т полиморфного маркера rs1205 (ген *CRP*) отличаются более низким содержанием *CRP* в плазме крови, чем носители аллеля *CRP*\*С [16]. Сходные результаты получены и в популяции Рейкьявика [17], американцев европейского происхождения и афро-американцев [18]. В то же время выявлена ассоциация генотипа *CRP*\*Т/Т с повышенным риском коронарного атеросклероза в греческой популяции [19], а также связь аллеля *CRP*\*Т с повышенным риском сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом типа 2 [20]. Согласно результатам ряда исследований, в эндотелиальных клетках *CRP* стимулирует экспрессию молекул адгезии (VCAM1, ICAM1 и селектина Е) [6], хемокина *CCL2* [7], снижает выработку оксида азота [21], тогда как на модельных животных не получено доказательств проатерогенных свойств *CRP*. Так, у мышей с «нокаутом» генов *APOE* и *LDLR* «выключение» гена *CRP* не приводило к существенному снижению

Таблица 2. Результаты анализа ассоциаций полиморфных ДНК-маркеров с риском ишемической болезни сердца

Генотип/ аллель	Контроль, %		Больные, %		P
	n	Частота (95%CI)	n	Частота (95%CI)	
<i>CRP</i> rs1205 (2042C>T)					
*C/C	83	33.2 (27.39–39.41)	57	26.27 (20.54–32.65)	0.1065
*C/T	127	50.8 (44.43–57.16)	106	48.85 (42.02–55.71)	0.7108
*T/T	40	16 (11.68–21.14)	54	24.88 (19.28–31.19)	0.0205
*C	293	58.6 (54.14–62.96)	220	50.69 (45.88–55.49)	0.0176
*T	207	41.4 (37.04–45.86)	214	49.31 (44.51–54.12)	
<i>SAA1</i> rs1136743 (A70V)					
*C/C	71	28.4 (22.9–34.42)	48	22.12 (16.78–28.24)	0.1363
*T/C	135	54 (47.61–60.3)	142	65.44 (58.7–71.75)	0.0141
*T/T	44	17.6 (13.09–22.9)	27	12.44 (8.36–17.58)	0.1549
*C	277	55.4 (50.92–59.81)	238	54.84 (50.02–59.59)	0.8951
*T	223	44.6 (40.19–49.08)	196	45.16 (40.41–49.98)	
<i>CX3CR1</i> rs3732378 (T280M)					
*C/C	162	64.8 (58.53–70.71)	141	64.98 (58.23–71.31)	1
*C/T	80	32 (26.26–38.17)	67	30.88 (24.8–37.48)	0.8418
*T/T	8	3.2 (1.39–6.21)	9	4.15 (1.91–7.73)	0.6272
*C	404	80.8 (77.07–84.16)	349	80.41 (76.36–84.05)	0.9339
*T	96	19.2 (15.84–22.93)	85	19.59 (15.95–23.64)	
<i>CCL2</i> rs1024611 (–2518A>G)					
*A/A	151	60.4 (54.04–66.51)	126	58.06 (51.2–64.71)	0.6373
A/G	82	32.8 (27.02–39)	70	32.26 (26.09–38.92)	0.9213
*G/G	17	6.8 (4.01–10.66)	21	9.68 (6.09–14.41)	0.3092
*A	384	76.8 (72.85–80.43)	322	74.19 (69.81–78.25)	0.3605
*G	116	23.2 (19.57–27.15)	112	25.81 (21.75–30.19)	
<i>CCR2</i> rs1799864 (V64I)					
*G/G	181	72.4 (66.41–77.85)	157	72.35 (65.89–78.19)	1
*G/A	61	24.4 (19.21–30.21)	55	25.35 (19.7–31.68)	0.8306
*A/A	8	3.2 (1.39–6.21)	5	2.3 (0.75–5.29)	0.5884
*G	423	84.6 (81.13–87.65)	369	85.02 (81.31–88.25)	0.9272
*A	77	15.4 (12.35–18.87)	65	14.98 (11.75–18.69)	

площади атеросклеротического поражения сосудов [22], а введение человеческого CRP мышам *LDLR*-/- не оказывало значимых эффектов [23]. Более того, есть сведения об антиатерогенных свойствах CRP – выявлена его способность связывать окисленные липопротеины низкой плотности [24], которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию хемокинов и молекул адгезии [25–27].

Полученные нами данные о роли полиморфных маркеров rs1024611 (ген *CCL2*) и rs1799864 (ген *CCR2*) в формировании наследственной предрасположенности к ИБС согласуются с результатами других исследований. Так, показана связь аллеля *CCL2*\*G с ишемическим инсультом у американцев [28]. Согласно данным метаанализа, проведенного по результатам 21 исследования, носительство аллеля *CCL2*\*G свя-

зано с повышенным риском ИБС у европейцев [29]. Выявлена ассоциация генотипа *CCR2*\*G/A с аневризмой абдоминальной части аорты у жителей Турции [30], в Чехии этот же генотип считается маркером риска развития ИМ у женщин в возрасте до 50 лет [31]. В ряде работ установлена связь генотипа *CCL2*\*G/G с более высоким содержанием *CCL2* в плазме крови [32, 33], а также с более высоким уровнем экспрессии гена *CCL2* по сравнению с носителями аллеля *CCL2*\*A [34]. Кроме того, ранее мы выявили ассоциацию генотипа *CCL2*\*G/G с повышенным риском ИМ, а также связь сочетания *CCL2*\*G/G+*CCR2*\*A с повышенным риском эссенциальной гипертензии среди татар Башкортостана [35, 36].

Сведения о роли полиморфного маркера rs3732378 (ген *CX3CR1*) неоднозначны. Обнаружена связь ал-

Таблица 3. Сочетания аллелей/генотипов, ассоциированные с ишемической болезнью сердца, полученные с помощью алгоритма APSampler

Сочетание	Частота, %		$P_{perm}$	OR	95%CI <sub>OR</sub>
	Контроль	Больные			
SAA1*T/T+CRP*C+CX3CR1*G/A	6.00	0.46	0.0056	0.07	0.009–0.55
SAA1*T+CX3CR1* G/A	7.30	0.92	0.0056	0.12	0.03–0.56
SAA1*T+CRP*T+CCR2*G/A+CX3CR1*G	0.40	5.53	0.0063	14.58	1.88–113.04
SAA1*T/C+CCR2*G+CCL2*G	19.60	30.41	0.0348	1.79	1.17–2.74
SAA1*T+CCR2*A+CCL2*G/G	0.40	4.15	0.0351	10.77	1.35–85.74
SAA1*T+CRP*T+CCR2*A+CX3CR1*A	1.20	5.53	0.039	4.82	1.34–17.31
SAA1*T+CRP*T/T	12.40	21.20	0.0393	1.9	1.16–3.12
CRP*T/T+CCR2*A+CCL2*G	0.80	4.61	0.0425	5.99	1.3–27.65
CRP*T+CCR2*G/A+CX3CR1*A	2.40	7.37	0.0436	3.24	1.24–8.43
SAA1*T/T+CRP*T+CCL2*A	16.80	10.15	0.049	0.5	0.29–0.89
CRP*C+CCL2*A	78.40	68.66	0.0492	0.6	0.4–0.92
SAA1*T/T+CX3CR1*G+CCL2*A	20.19	9.22	0.0492	0.5	0.29–0.89

леля CX3CR1\*M с более низкими показателями клеточной адгезии и хемотаксиса лейкоцитов, а также со сниженным риском ИБС [37]. В то же время выявлена связь аллеля CX3CR1\*M с сахарным диабетом типа 2 у американцев европейского происхождения [38]. Согласно результатам метаанализа 49 исследований, генотип CX3CR1\*T/M связан с пониженным риском атеросклероза и ИБС, а генотип CX3CR1\*M/M ассоциирован с повышенным риском ишемической цереброваскулярной патологии [39], что согласуется с полученными нами данными.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что результаты нашей работы подтверждают предположение о влия-

нии полиморфизма генов SAA1, CRP, CCL2, CCR2 и CX3CR1 на процессы, играющие важную роль в патогенезе ИБС. Также показано, что одни и те же аллельные варианты генов SAA1 и CRP могут в зависимости от генетического окружения оказывать как негативное, так и благоприятное влияние на развитие заболевания, что иллюстрирует тезис о сложном нелинейном взаимодействии изученных факторов и не противоречит результатам, полученным в других исследованиях. ●

*Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ross R. // Nature. 1993. V. 362. P. 801–809.
- Han K.H., Tangirala R.K., Green S.R., Quehenberger O. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1998. V. 18. № 12. P. 1983–1991.
- Zhang S., Wang X., Zhang L., Yang X., Pan J., Ren G. // J. Atherosclerosis Thrombosis. 2011. V. 18. № 10. P. 846–856.
- Haskell C.A., Cleary M.D., Charo I.F. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 44. P. 34183–34189.
- White G.E., Greaves D.R. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2012. V. 32. № 3. P. 589–594.
- Pasceri V., Willerson J.T., Yeh E.T. // Circulation. 2000. V. 102. № 18. P. 2165–2168.
- Pasceri V., Cheng J.S., Willerson J.T., Yeh E.T. // Circulation. 2011. V. 103. № 21. P. 2531–2534.
- Gouwy M., Buck M., Pörtner N., Opdenakker G., Proost P., Struyf S., Damme J. // Eur. J. Immunol. 2015. V. 45. № 1. P. 101–112.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. V. 2. P. 14–9.23.
- Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. // Genetics. 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121.
- Мякоткин В.А., Муравьев Ю.В., Алексева А.В., Кадникова В.А., Поляков А.В. // Научно-практическая ревматология. 2012. Т. 53. № 4. С. 40–43.
- Yilmaz E., Balci B., Kutlay S., Ozen S., Erturk S., Oner A., Besbas N., Bakaloglu A. // Turkish J. Pediatrics. 2003. V. 45. № 3. P. 198–202.
- van Lenten B.J., Hama S.Y., de Beer F., Stafforini D.M., McIntyre T.M., Prescott S.M., La Du B.N., Fogelman A.M., Navab M. // J. Clin. Invest. 1995. V. 96. № 6. P. 2758–2767.
- Zimlichman S., Danon A., Nathan I., Mozes G., Shainkin-Kestenbaum R. // J. Lab. Clin. Med. 1990. V. 116. № 2. P. 180–186.
- Stonik J.A., Remaley A.T., Demosky S.J., Neufeld E.B.,

- Bocharov A., Brewer H.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. № 4. P. 936–941.
16. Kolz M., Koenig W., Müller M., Andreani M., Greven S., Illig T., Khuseyinova N., Panagiotakos D., Pershagen G., Salomaa V., et al. // *Eur. Heart J.* 2008. V. 29. № 10. P. 1250–1258.
17. Eiriksdottir G., Smith A.V., Aspelund T., Hafsteinsdottir S.H., Olafsdottir E., Launer L.J., Harris T.B., Gudnason V. // *Int. J. Obes.* 2009. V. 33. № 2. P. 267–272.
18. Lange L.A., Carlson C.S., Hindorf L.A., Lange E.M., Walston J., Durda J.P., Cushman M., Bis J.C., Zeng D., Lin D., et al. // *JAMA.* 2006. V. 296. № 22. P. 2703–2711.
19. Hatzis G., Tousoulis D., Papageorgiou N., Miliou A., Bouras G., Tsioufis C., Sinetos A., Latsios G., Siasos G., Stefanadis C. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012. V. 59. № 13. P. E1413.
20. Papaioannidou S., Tousoulis D., Tentolouris N., Papageorgiou N., Miliou A., Androulakis E., Antoniadis C., Stefanadis C. // *J. Diabetes Metab.* 2015. V. 6. № 4. P. 529.
21. Hein T. W., Singh U., Vasquez-Vivar J., Devaraj S., Kuo L., Jialal I. // *Atherosclerosis.* 2009. V. 206. № 1. P. 61–68.
22. Teupser D., Weber O., Rao T.N., Sasse K., Thiery J., Fehling H.J. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 8. P. 6272–6279.
23. Torzewski M., Reifenberg K., Cheng F., Wiese E., Küpper I., Crain J., Lackner K.J., Bhakdi S. // *Thromb. Haemost.* 2008. V. 99. № 1. P. 196–201.
24. Tabuchi M., Inoue K., Usui-Kataoka H., Kobayashi K., Teramoto M., Takasugi K., Shikata K., Yamamura M., Ando K., Nishida K., et al. // *J. Lipid Res.* 2007. V. 48. № 4. P. 768–781.
25. Lei Z.B., Zhang Z., Jing Q., Qin Y.W., Pei G., Cao B.Z., Li X.Y. // *Cardiovascular Res.* 2002. V. 53. № 2. P. 524–532.
26. Amberger A., Maczek C., Jürgens G., Michaelis D., Schett G., Trieb K., Eberl T., Jindal S., Xu Q., Wick G. // *Cell Stress Chaperones.* 1997. V. 2. № 2. P. 94–103.
27. Barlic J., Zhang Y., Murphy P.M. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 26. P. 19167–19176.
28. Arakelyan A., Zakharyan R., Hambardzumyan M., Petrkoval J., Olsson M.C., Petrek M., Boyajyan A. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2014. V. 34. № 2. P. 100–105.
29. Bai X.Y., Li S., Wang M., Qu X., Hu G., Xu Z., Chen M., He G.-W., Wu H. // *Ann. Hum. Genet.* 2015. V. 79. № 3. P. 173–187.
30. Katrancioglu N., Manduz S., Karahan O., Yilmaz M.B., Sezgin I., Bagci G., Berkan O. // *Angiolog.* 2011. V. 62. № 2. P. 140–143.
31. Petrkoval J., Cermakova Z., Drabek J., Lukl J., Petrek M. // *Immunol. Lett.* 2003. V. 88. № 1. P. 53–55.
32. Zakharyan R., Boyajyan A., Arakelyan A., Melkumova M., Mrazek F., Petrek M. // *Cytokine.* 2012. V. 58. № 3. P. 351–354.
33. McDermott D.H., Yang Q., Kathiresan S., Cupples L.A., Massaro J.M., Keaney J.F., Larson M.G., Vasani R.S., Hirschhorn J.N., O'Donnell C.J., Murphy P.M., Benjamin E.J. // *Circulation.* 2005. V. 112. № 8. P. 1113–1120.
34. Rovin B.H., Lu L., Saxena R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 259. № 2. P. 344–348.
35. Насибуллин Т.Р., Садикова Р.И., Тимашева Я.Р., Эрдман В.В., Николаева И.Е., Мустафина О.Е. // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 2. С. 236–243.
36. Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Эрдман В.В., Николаева И.Е., Мустафина О.Е. // *Молекулярная медицина.* 2015. № 3. С. 62–64.
37. McDermott D.H., Fong A.M., Yang Q., Sechler J.M., Cupples L.A., Merrell M.N., Wilson P.W., D'Agostino R.B., O'Donnell C.J., Patel D.D., Murphy P.M. // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111. № 8. P. 1241–1250.
38. Shah R., Hinkle C.C., Ferguson J.F., Mehta N.N., Li M., Qu L., Lu Y., Putt M.E., Ahima R.S., Reilly M.P. // *Diabetes.* 2011. V. 60. № 5. P. 1512–1518.
39. Wu J., Yin R.X., Lin Q.Z., Guo T., Shi G.Y., Sun J.Q., Shen S.W., Li Q. // *Disease Markers.* 2014. V. 2014. P. 1–13.

УДК 577.152.314

# Клонирование и характеристика новой сайт-специфической метилзависимой эндонуклеазы ElmI, узнающей и расщепляющей С5-метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)<sup>5</sup>NG(5mC)-3'

В. А. Чернухин\*, Д. А. Гончар, М. А. Абдурашитов, О. А. Беличенко, В. С. Дедков, Н. А. Михненкова, Е. Н. Ломаковская, С. Г. Удальева, С. Х. Дегтярёв  
ООО «СибЭнзайм», 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

\*E-mail: valera@sibenzyme.ru

Поступила в редакцию 13.08.2015

Принята к печати 23.11.2015

**РЕФЕРАТ** В результате поиска аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательности MD-эндонуклеазы *BisI*, в геномах энтеробактерий выявлены предполагаемые открытые рамки считывания MD-эндонуклеаз. Высокая консервативность нуклеотидных последовательностей данных рамок у энтеробактерий разных родов (*Escherichia*, *Klebsiella* и *Cronobacter*) позволила создать праймеры для проведения ПЦР-скрининга на ДНК энтеробактерий, собранных из природных источников. С использованием геномной ДНК *E. coli* LM N17 в качестве матрицы амплифицирован и встроен в вектор pMTL22 фрагмент ДНК длиной около 440 п.н. В штамме *E. coli* ER2267, трансформированном полученной конструкцией, выявлена эндонуклеазная активность. Из биомассы данного штамма хроматографическими методами получен препарат нового фермента ElmI. Оказалось, что ElmI подобно *BisI* специфично расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3' перед центральным нуклеотидом «N» при условии, что она содержит два остатка 5-метилцитозина. Однако, в отличие от *BisI*, ElmI с большей эффективностью расщепляет эту последовательность при наличии в ней более двух метилированных остатков цитозина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** анализ метилома, клонирование генов ДНК-эндонуклеаз, метилзависимые ДНК-эндонуклеазы, MD-эндонуклеазы, эпигенетика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** MD-эндонуклеаза – сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза.

## ВВЕДЕНИЕ

Сайт-специфические метилзависимые эндонуклеазы (MD-эндонуклеазы) узнают и расщепляют ДНК по определенным метилированным последовательностям и не расщепляют неметилированную ДНК. За последние 9 лет описано более 10 прототипов этих ферментов с разными сайтами узнавания, которые расщепляются лишь при условии С5-метилирования определенных остатков цитозина в них.

MD-эндонуклеазы, в отличие от эндонуклеаз рестрикции, узнают не только определенную нуклеотидную последовательность и положение гидролизуемой связи относительно этой последовательности, но и строго определенный узор метилирования. Поэтому разные MD-эндонуклеазы даже со сходным сайтом узнавания могут по-разному расщеплять

ДНК в зависимости от характера ее метилирования. Это хорошо видно на примере ферментов, узнающих метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'. Так, среди ферментов с таким сайтом узнавания и с гидролизуемой позицией после центрального нуклеотида «N» *BisI* [1] расщепляет эту последовательность при наличии в ней, как минимум, двух, а *PkrI* [2] – трех остатков 5-метилцитозина. Среди ферментов, гидролизующих связь перед центральным нуклеотидом «N», MD-эндонуклеаза *BisI* [3] расщепляет 5'-GCNGC-3' при наличии двух 5-метилцитозинов (и намного менее эффективно в случае одного), тогда как для *GluI* [4] нужны четыре остатка 5-метилцитозина.

Нами описан новый представитель данной группы ферментов – MD-эндонуклеаза ElmI, узнающая

метилованную последовательность 5'-GCNGC-3' и расщепляющая ее перед центральным нуклеотидом «N» (с образованием 5'-выступающих однонуклеотидных концов), если содержит не менее двух остатков 5-метилцитозина, причем активность фермента увеличивается на порядок, если в сайте узнавания метилированы три или четыре остатка цитозина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Проведение ПЦР-скрининга на ДНК энтеробактерий из природных образцов и получение плазмиды pElmI, несущей ген новой MD-эндонуклеазы

Колиформные бактерии выделяли из природных образцов (сточных вод) на селективной среде Эндо согласно [5]. Из посевов каждого образца отбирали по 8–20 штаммов (серии LM, LT, LP и LV), отличающихся по морфологическим характеристикам.

Из полученных штаммов выделяли хромосомную ДНК, на которой проводили ПЦР-скрининг с использованием праймеров, приведенных ниже. Фрагмент, амплифицированный с ДНК одного из штаммов дикого типа, встраивали в плазмиду pMTL22 [6] по сайтам эндонуклеаз рестрикции FauNDI и BglII.

После трансформации клеток *E. coli* ER2267 клоны, несущие целевую плазмиду, названную pElmI, высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). Клоны подращивали в течение ночи при 37°C, после чего пересевали на отдельные чашки с ампициллином (100 мкг/мл) и вновь выдерживали в течение ночи с целью дальнейшего анализа.

### Наработка биомассы рекомбинантного штамма-продуцента ElmI и тестирование целевой активности

Рекомбинантный клон штамма *E. coli* ER2267, трансформированного плазмидой pElmI, переносили с чашки Петри микробиологической петлей во флакон с 200 мл бульона LB, содержащего 100 мкг/мл ампициллина. Инокулят подращивали в течение ночи на термостатированной качалке при 37°C и 120 об/мин.

Далее по 5 мл инокулята засеивали в 20 флаконов с 200 мл бульона LB, содержащего 100 мкг/мл ампициллина и 0.5 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG).

Культуру подращивали в термостатированной качалке при 120 об/мин в течение 10 ч, после чего для анализа активности фермента отбирали аликвоту выросшей культуры (1 мл) и переносили ее в пробирку Eppendorf на 1.5 мл. Клетки осаждали

в настольной центрифуге 5416 Eppendorf (Eppendorf GmbH, Германия) при 12000 об/мин в течение 2 мин. Супернатант убирали, а осадок суспендировали в 0.2 мл лизирующего буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8.5, 0.1 мг/мл лизоцима, 0.5 М NaCl, 1 мМ EDTA, 0.1% Тритон X-100).

Активность фермента в лизате определяли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей в качестве субстрата ДНК плазмиды pFsp4HI3 [4], предварительно линеаризованной рестриктазой DriI в SE-буфере «W» (10 мМ трис-HCl (pH 8.5 при 25°C), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол) в течение 2 ч при 37°C. За 1 ед. акт. ElmI принимали количество фермента, достаточное для исчерпывающего гидролиза 1 мкг ДНК pFsp4HI3 в SE-буфере «W» за 2 ч при 37°C. Наличие или отсутствие гидролиза субстратной ДНК определяли методом электрофореза в 1% агарозном геле.

Клетки всей наработанной биомассы осаждали на центрифуге J2-21 (Beckman, США) в течение 30 мин (ротатор JA-10, 8000 об/мин) и замораживали.

### Получение препарата фермента ElmI

Все процедуры выделения и очистки препарата фермента проводили при 4°C с использованием следующих растворов:

- буфер А – 10 мМ трис-HCl, pH 7.5; 0.1 мМ EDTA; 7 мМ 2-меркаптоэтанол;
- буфер В – 10 мМ К-фосфатный буфер, pH 7.4; 0.1 мМ EDTA; 7 мМ 2-меркаптоэтанол.

Ферментативную активность определяли с использованием в качестве субстрата ДНК pFsp4HI3 [4] в SE-буфере «W», которую гидролизовали в течение 15 мин в 20 мкл реакционной смеси путем добавления аликвот (1 мкл) из фракций хроматографического профиля.

**Получение грубого экстракта.** Биомассу (8 г) суспендировали в 30 мл буфера А, содержащего 0.2 М NaCl, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF), 0.1% Тритон X-100; 0.1 мг/мл лизоцима. Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 (MSE, Великобритания), снабженного адаптором диаметром 2 см, при амплитуде 20 мкм, 4 раза по 1 мин с интервалом в 1 мин для охлаждения суспензии в водяной бане.

Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 30 мин (ротаторе JA-20, центрифуга J2-21, Beckman, США).

**Хроматография на фосфоцеллюлозе P-11.** Грубый экстракт разбавляли в 2 раза буфером А и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 объемом 30 мл, уравновешенную буфером А, содержащим

0.1 М NaCl, промывали 160 мл этого же буфера. Адсорбированный материал вымывали линейным градиентом NaCl от 0.1 до 1 М объемом 800 мл в буфере А. Собирали 30 фракций, из которых объединяли фракции с 16 по 22 (от 0.35 до 0.47 М NaCl), содержащие пик целевой активности.

**Хроматография на гидроксилпатите.** Объединенные фракции наносили на колонку с гидроксилпатитом объемом 2 мл, уравновешенную буфером В, содержащим 0.05 М NaCl, промывали 10 мл этого же буфера. Адсорбированный материал вымывали линейным градиентом К-фосфатного буфера, рН 7.4, от 0.01 до 0.1 М, содержащим 0.05 М NaCl, объемом 30 мл. Собрали градиент из 20 фракций, из которых объединяли фракции с 8 по 12 (от 0.044 до 0.056 М калий-фосфата), содержащие пик активности ElmI. Полученные фракции диализовали в течение 1 ч в 300 мл буфера А.

**Хроматография на гепарин-агарозе.** Диализованные фракции наносили на колонку с гепарин-агарозой объемом 2 мл, уравновешенную в буфере В, содержащим 0.05 М NaCl, и промывали 4 мл этого же буфера. Адсорбированный материал вымывали линейным градиентом NaCl (0.05 до 1 М) в буфере В объемом 30 мл. Собрали 20 фракций, из которых объединяли фракции 12 и 13 (с градиентом от 0.62 до 0.67 М NaCl), содержащие целевую активность.

**Концентрирование, проверка активности и хранение препарата.** Полученные фракции диализовали в течение 20 ч против 15-кратного объема буфера В с 50% глицерином, 0.2 М NaCl и хранили при -20°C.

Активность проверяли добавлением восьми последовательных двукратных разведений препарата фермента (2, 1, 1/2 мкл и т.д.) к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 мкг ДНК pFsp4HI3/DriI в SE-буфере «W» с последующей инкубацией в течение 2 ч при 37°C. Для получения разбавленных препаратов ферментов использовали SE-буфер для разбавления ферментов «B100» (10 mM трис-HCl (pH 7.6 при 25°C), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 200 мкг/мл БСА, 1 mM дитиотреитол, 50% глицерин). Реакцию останавливали, добавляя в каждую реакционную смесь 1 мкл стоп-буфера следующего состава: 50% глицерин, 10 mM EDTA, 0.2% бромфеноловый синий.

**Нуклеотидную последовательность ДНК** определяли по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3130xI Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Препараты ферментов, ДНК, дезокси-нуклеозид-трифосфатов и синтетических олигонуклеотидов,**

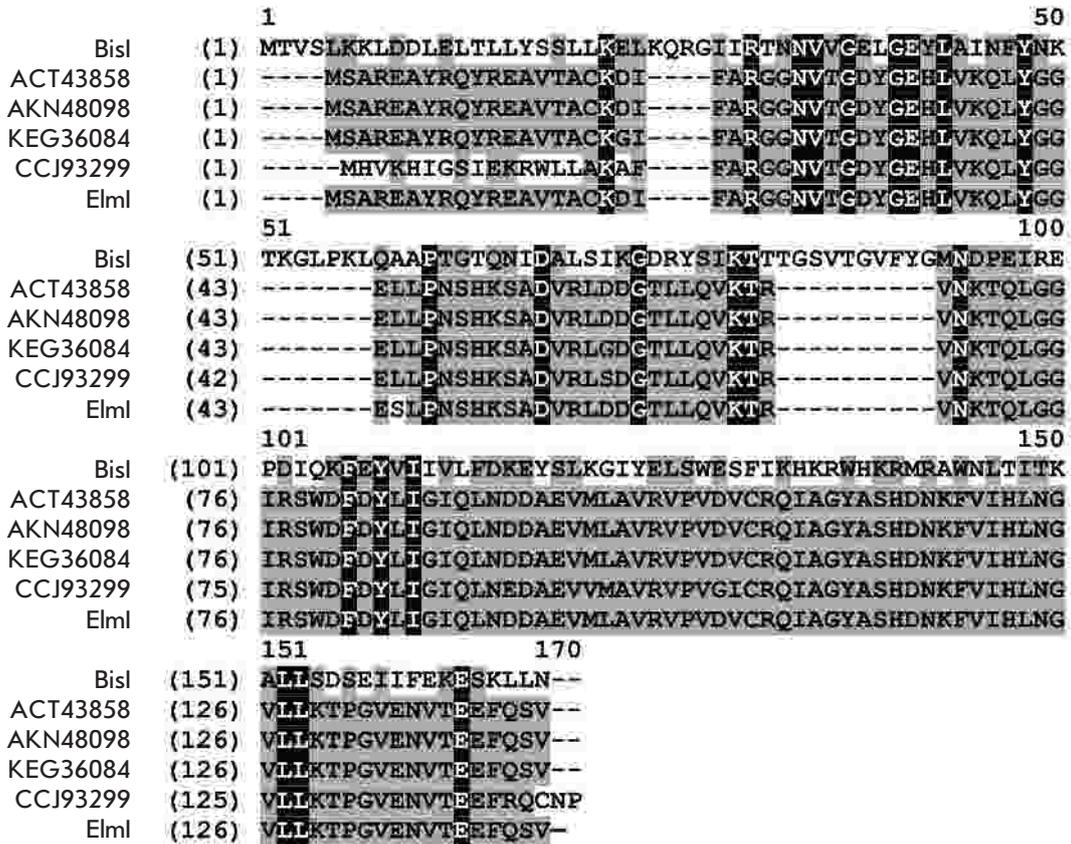
а также маркеры молекулярных масс (1 kb Ladder и Lambda/StyI), использованные в работе, произведены в ООО «СибЭнзайм» (Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Клонирование гена новой MD-эндонуклеазы ElmI и сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Описанные нами ранее MD-эндонуклеазы обнаружены в бактериях различных таксономических групп, но в основном среди представителей семейств Microbacteriaceae и Bacillaceae. Скрининг активности в лизатах клеток, проведенный ранее, не позволил нам выявить подобные сайт-специфические ферменты в штаммах энтеробактерий, что может свидетельствовать либо об отсутствии, либо о крайне низкой активности MD-эндонуклеаз у бактерий этой группы. Поэтому для решения этого вопроса была предпринята попытка найти гомологичные белки энтеробактерий не биохимическим, а биоинформатическим способом.

В базе данных аминокислотных последовательностей энтеробактерий с помощью программы PSI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) проведен поиск последовательностей, гомологичных ранее определенной нами MD-эндонуклеазе BisI (GenBank AJW87312) [7]. После выполнения двух итераций поиска у энтеробактерий обнаружили около 50 аминокислотных последовательностей, обладающих гомологией (32–48% сходства и 17–30% идентичности) с последовательностью BisI, причем функция ни одного из выявленных белков-гомологов еще не установлена. Нуклеотидные последовательности соответствующих генов извлечены из базы данных GenBank и сравнены между собой. Показано, что в выборке присутствуют две группы генов, нуклеотидные последовательности которых высокогомологичны между собой. Первая группа включает гены четырех гипотетических белков длиной 143–144 аминокислотных остатка бактерий родов *Escherichia* (ACT43858 и AKN48098), *Cronobacter* (CCJ93299) и *Klebsiella* (KEG36084), в скобках указаны идентификационные номера в базе данных GenBank. Сравнение этих генов между собой показало, что степень их идентичности составляет 93–99%. Вторая группа представлена генами энтеробактерий, кодирующими белки из 290 аминокислотных остатков, N-концевая часть которых гомологична белку BisI (номера белков в GenBank: KFC97828, WP\_000794335, WP\_000794336, WP\_000794337, WP\_001655794, WP\_004952390, WP\_008806407, WP\_021557167, WP\_025912430, WP\_032653240, WP\_032671961 и WP\_033070923). Степень идентич-



**Рис. 1.** Выравнивание аминокислотных последовательностей BisI и ElmI и наиболее гомологичных белков энтеробактерий. Аминокислотные последовательности обозначены номерами в GenBank как описано в тексте. Белым цветом на черном фоне показаны аминокислотные остатки, идентичные во всех представленных аминокислотных последовательностях. Черным цветом на сером фоне выделены аминокислоты, сходные по физико-химическим свойствам

ности нуклеотидных последовательностей в данной группе составляет 83–99%.

На рис. 1 приведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей четырех высокогомологичных белков энтеробактерий из первой группы с последовательностью BisI. Также приведена последовательность обнаруженной путем ПЦР-скрининга эндонуклеазы ElmI (см. описание ниже).

Множественное выравнивание соответствующих генов энтеробактерий первой группы, приведенное на рис. 2, показало высокую степень идентичности и на уровне нуклеотидного состава, несмотря на принадлежность хозяев к разным родам. В это выравнивание добавлена также последовательность гена *elmI*, полученная в ходе дальнейшей работы.

Высокий уровень идентичности последовательностей генов из двух вышеупомянутых групп, который распространяется и на их концевые участки, позволил подобрать праймеры для ПЦР-скрининга

аналогичных генов в штаммах дикого типа. Для поиска генов, кодирующих белки, родственные белкам представителей первой группы, использовали праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции FauNDI и VamHI, для встраивания ПЦР-фрагментов в плазмидный вектор:

Esp-1 5'-CCCCCATATGAGTGCACGTGAAGCAT-ATC-3'

Esp-2 5'-CGCGGATCCTTAGGGATTACACTGAC-TGAAACTCTTC-3'.

Для ПЦР-скрининга генов, аналогичных генам второй группы, были синтезированы праймеры:

Esp-3 – 5'-TTGAAAAATAATCATTTAACATCATATG-3'

Esp-4 – 5'-TCACTCCAGAACGCTGATAAGTTT-3'.

Из 64 штаммов колиформных бактерий, обнаруженных в сточных водах, была выделена геномная ДНК, которая служила матрицей для проведения ПЦР. Стоит отметить, что амплификация с исполь-

зованием праймеров Esp-3 и Esp-4 (вторая группа генов) не привела к появлению фрагмента ожидаемой длины (~870 п.н.) ни с одной из матричных ДНК. При использовании пары праймеров Esp-1 и Esp-2 (первая группа генов) положительный результат получен для одного из образцов ДНК – обнаружен ПЦР-фрагмент ожидаемой длины ~430 п.н.

Этот амплифицированный фрагмент был обработан рестриктазами FauNDI и BamHI и лигирован в вектор pMTL22, предварительно расщепленный FauNDI и BglII. Полученной плазмидой, названной pElmI, трансформировали клетки *E. coli* ER2267.

Определение таксономической специфичности исходного штамма, с геномной ДНК которого получен амплифицированный фрагмент, проведено с использованием традиционных биохимических и морфологических критериев [8], а также с помощью анализа структуры фрагмента 16S рРНК по программе BLAST [9]. Исходный природный штамм-продуцент обозначен как *E. coli* LM N17. Продуцируемая этим штаммом сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза названа ElmI.

Проведено секвенирование встроенного в плазмиду pElmI ПЦР-фрагмента. Нуклеотидная последовательность этого фрагмента длиной 432 п.н. депонирована в базу данных GenBank под номером LN869919. Последовательность начинается со стартового кодона ATG и заканчивается стоп-кодоном TAA (причем в гипотетической рамке трансляции отсутствуют другие стоп-кодоны), поэтому может рассматриваться как гипотетическая рамка трансляции ДНК-эндонуклеазы ElmI, а ген, кодирующий этот белок, – *elmI*.

Согласно результатам сравнительного анализа секвенированного фрагмента ген *elmI* имеет практически такую же последовательность, как и гены, кодирующие полипептиды из ближайших гомологов – штаммов *E. coli* BL21(DE3) (ACT43858) и C41(DE3) (AKN48098). Единственная найденная замена – цитозин в положении 131 в гене *elmI* вместо тимина в гомологичных генах (рис. 2).

Выведенная аминокислотная последовательность эндонуклеазы ElmI соответственно отличается от ближайших гомологов из штаммов *E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3) одним аминокислотным остатком: в позиции 44 у ElmI находится серин, тогда как у ближайших гомологов (*E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3)) в аналогичной позиции стоит лейцин (рис. 1). В то же время сходство аминокислотной последовательности ElmI и BisI составляет около 50% при том, что количество идентичных аминокислот всего 112%. Таким образом, клонированный фрагмент ДНК, выявленный в результате ПЦР-скрининга и представленный предполагаемым геном метилза-

висимой ДНК-эндонуклеазы ElmI, оказывается высокоомологичным участкам геномных ДНК из хорошо известных штаммов *E. coli*.

### Определение специфичности новой MD-эндонуклеазы ElmI

В лизате клонов *E. coli* ER2267, несущих плазмиду pElmI, в отличие от исходного штамма, обнаружена эндонуклеазная активность, и один из клонов *E. coli* pElmI был выбран для наработки биомассы и выделения фермента.

По схеме, описанной в разделе «Экспериментальная часть», наработано 8 г биомассы *E. coli* pElmI. В результате хроматографической очистки из данной биомассы получено 3 мл препарата фермента ElmI с концентрацией 4 ед. акт./мл.

С целью определения сайт-специфичности ElmI различные субстратные ДНК расщепили в предварительно установленных оптимальных условиях: 37°C, реакционный SE-буфер «W», 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 мкг субстратной ДНК, в течение 2 ч. ДНК расщепляли контрольным ферментом BisI в тех же условиях, но с использованием реакционного SE-буфера «Y».

В качестве субстрата для определения специфичности фермента ElmI использовали ДНК плазмид, содержащих гены различных ДНК-метилтрансфераз. Благодаря активности этих генов в штаммах *E. coli*, из которых выделены плазмиды, ДНК-субстраты оказывались модифицированными соответствующими ДНК-метилтрансферазами и несли определенный узор метилирования.

В качестве метилированных ДНК-субстратов использовали следующие плазмиды:

1) рМНраII, содержащая ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу НраII, вследствие чего в данной плазмиде метилирован первый цитозин во всех последовательностях 5'-CCGG-3' на обеих цепях ДНК [10];

2) рМНаеIII, содержащая ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу НаеIII, вследствие чего в данной плазмиде метилирован первый цитозин во всех последовательностях 5'-GGCC-3' на обеих цепях ДНК [11];

3) рНспAI2, содержащая ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу НспAI, вследствие чего в плазмиде метилирован первый цитозин во всех последовательностях 5'-GCGC-3' на обеих цепях ДНК [12]. Кроме того, данная плаزمида содержит гиперметилированный участок:

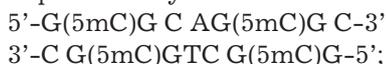
5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)GC-3'  
3'-CG(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5';

4) рНспAI4, также содержащая ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу НспAI, вследствие чего в плазмиде метилирован первый цитозин во всех по-

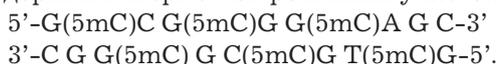
<i>elml</i>	(1)	ATCAGTGCACGTGAAGCATATC	GGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
ACT43858	(1)	ATCAGTGCACGTGAAGCATATC	GGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
KEG36084	(1)	ATGAGTGCACGTGAAGCATATC	GGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
AKN48098	(1)	ATGAGTGCACGTGAAGCATATC	GGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
CCJ93299	(1)	----GTGCACGTGAAGCATATC	GGCAGTATCGAGAAGCGGTGCTGCTTGCAAAG
<i>elml</i>	(56)	ACATTTTT-GCCCGAGGTGGTAATGTC	CACTGGTGATTAACGGTGAACATCTCGTAA
ACT43858	(56)	ACATTTTT-GCCCGAGGTGGTAATGTC	CACTGGTGATTAACGGTGAACATCTCGTAA
KEG36084	(56)	SCATTTTT-GCCCGAGGTGGTAATGTC	CACTGGTGATTAACGGTGAACATCTCGTAA
AKN48098	(56)	SCATTTTT-GCCCGAGGTGGTAATGTC	CACTGGTGATTAACGGTGAACATCTCGTAA
CCJ93299	(52)	SCATTTTTTGCCCGAGGTGGTAATGTC	CACTGGTGATTAACGGTGAACATCTCGTAA
<i>elml</i>	(110)	AGCAACTTTATGGTGGTGAATC	ATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTCAG
ACT43858	(110)	AGCAACTTTATGGTGGTGAATC	ATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTCAG
KEG36084	(110)	AGCAACTTTATGGCGGTGAATC	ATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAAG
AKN48098	(110)	AGCAACTTTATGGCGGTGAATC	ATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAAG
CCJ93299	(107)	AGCAACTTTATGGGGGTGAATC	ATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAAG
<i>elml</i>	(165)	ATTACGATGGACGCTGTTGCAGGTCAA	AACCAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
ACT43858	(165)	ATTACGATGGACGCTGTTGCAGGTCAA	AACCAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
KEG36084	(165)	ATTACGATGGACGCTATTGCAGGTCAA	AACCAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
AKN48098	(165)	ATTACGATGGACGCTATTGCAGGTCAA	AACCAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
CCJ93299	(162)	ATTAAGCGATGGGACGCTGTTGCAGGTCAA	AACCAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
<i>elml</i>	(220)	GGCGGAATTCGCTCCTGGGATTT	CGATTACCTGATCGGTATTTCAGCTTAATGAAG
ACT43858	(220)	GGCGGAATTCGCTCCTGGGATTT	CGATTACCTGATCGGTATTTCAGCTTAATGAAG
KEG36084	(220)	GGCGGAATTCGCTCCTGGGATTT	CGATTACCTGATCGGTATTTCAGCTTAATGAAG
AKN48098	(220)	GGCGGAATTCGCTCCTGGGATTT	CGATTACCTGATCGGTATTTCAGCTTAATGAAG
CCJ93299	(217)	GGCGGAATTCGCTCCTGGGATTT	CGATTACCTGATCGGCATTTCAGCTTAATGAAG
<i>elml</i>	(275)	ATGCCGAAGTATGTTGGCAGTT	CGTGTCCCTGTAGATGTTTGTGCGCCAAATTGC
ACT43858	(275)	ATGCCGAAGTATGTTGGCAGTT	CGTGTCCCTGTAGATGTTTGTGCGCCAAATTGC
KEG36084	(275)	ATGCCGAAGTATGTTGGCAGTT	CGTGTCCCTGTAGATGTTTGTGCGCCAAATTGC
AKN48098	(275)	ATGCCGAAGTATGTTGGCAGTT	CGTGTCCCTGTAGATGTTTGTGCGCCAAATTGC
CCJ93299	(272)	ATGCCGAAGTAGTGATGGCAGTT	CGTGTCCCTGTGGGTATTTGTGCGCCAAATTGC
<i>elml</i>	(330)	CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTT	TGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
ACT43858	(330)	CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTT	TGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
KEG36084	(330)	CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTT	TGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
AKN48098	(330)	CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTT	TGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
CCJ93299	(327)	CGGATATGCCAGCCACGATAACAAATTT	TGTGATCCATCTCAATGGCGTGCTTCTT
<i>elml</i>	(385)	AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCAC	TGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAAATCCCTAA
ACT43858	(385)	AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCAC	TGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAAATCCCTAA
KEG36084	(385)	AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCAC	TGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAA-----
AKN48098	(385)	AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCAC	TGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAA-----
CCJ93299	(382)	AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCAC	TGAAGAGTTTC-GTCAATGTAAATCCCTAA

Рис. 2. Выравнивание нуклеотидной последовательности предполагаемого гена, кодирующего Elml (ген *elml*), с ближайшими наиболее гомологичными последовательностями. Нуклеотидные последовательности обозначены по номерам кодируемых ими белков в GenBank. Серым фоном выделены нуклеотиды, идентичные у большинства, но не у всех из пяти проанализированных последовательностей. Нуклеотиды, не встречающиеся в большинстве последовательностей, выделены курсивом и подчеркнуты. Рамкой в последовательности гена *elml* выделен единственный нуклеотид, по которому ген отличается от ближайших гомологов из штаммов BL21(DE3) и C41(DE3) *E. coli*. Рамками с 5'- и 3'-концов выделены последовательности, соответствующие праймерам, с помощью которых проведен ПЦР-скрининг на геномных ДНК колиформных бактерий, выделенных из природных источников

следовательностях 5'-GCGC-3' на обеих цепях ДНК [12]. Кроме того, данная плаزمида содержит гиперметилированный участок:



5) pFsp4HI3, содержащая ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу Fsp4HI, в результате чего в плазмиде во всех последовательностях 5'-GCNGC-3' метилирован первый цитозин [4]. Данная плазмида содержит гиперметилированный участок:



Все плазмиды были предварительно переведены из кольцевой формы в линейную путем гидролиза эндонуклеазой рестрикции DriI по уникальному (для каждой плазмиды) сайту 5'-GACNNNNNGTC-3'.

Результаты анализа сайт-специфичности на данных ДНК-субстратах приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, ElmI не расщепляет последовательности, метилированные ДНК-метилтрансферазами HpaII (дорожка 2), HspAI2 (дорожка 4) и HaeIII (дорожка 6), т.е. последовательности 5'-C(5mC)GG-3'/3'-GG(5mC)C-5', 5'-G(5mC)-GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' и 5'-GG(5mC)C-3'/3'-C(5mC)GG-5' соответственно не являются сайтами узнавания ElmI.

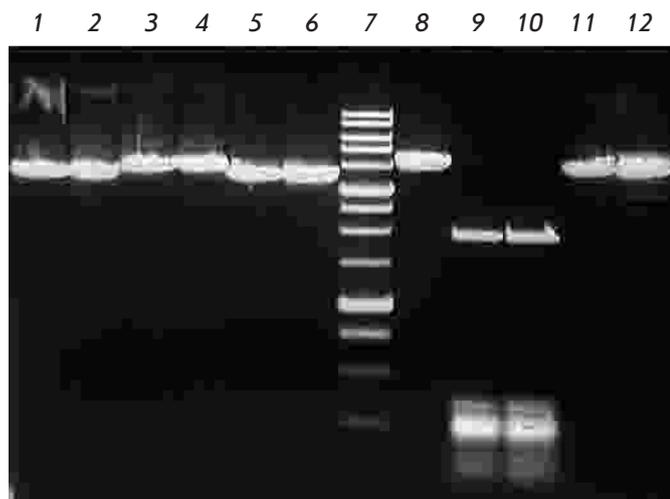


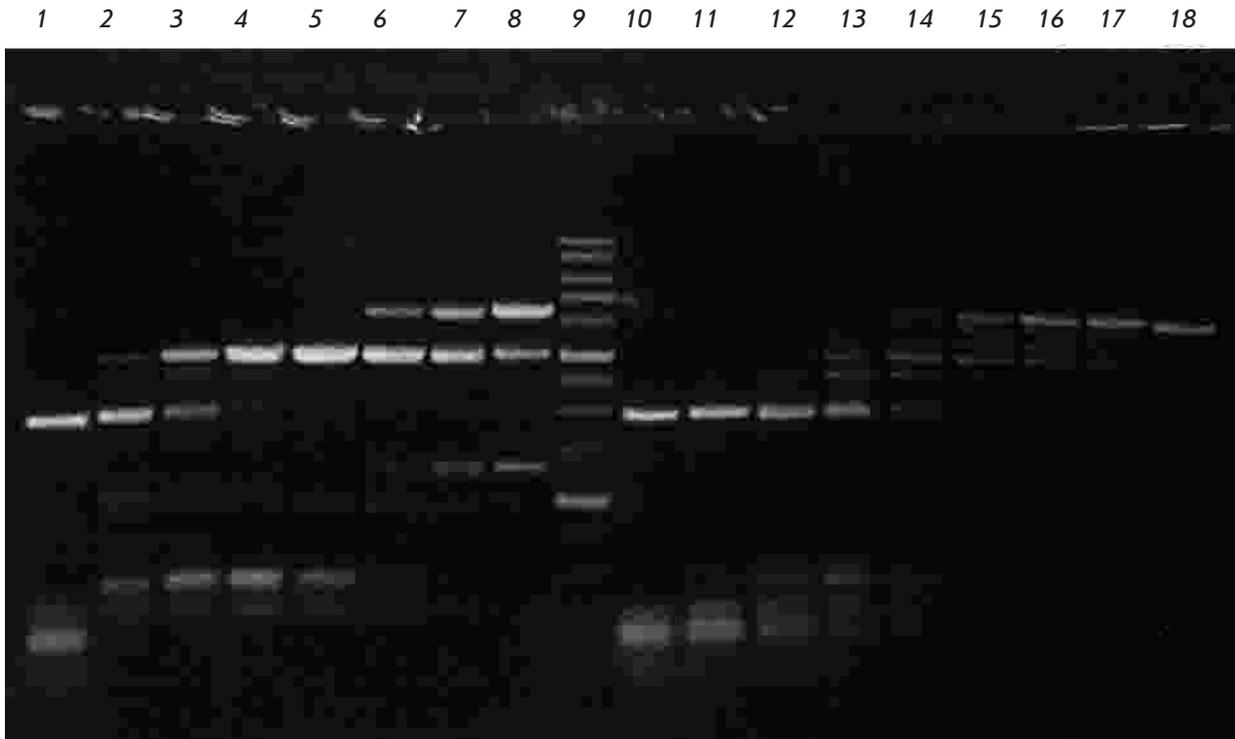
Рис. 3. Анализ сайт-специфичности ElmI на различных C5-метилированных ДНК-субстратах. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1 – pMHpaII/DriI; 2 – pMHpaII/DriI + ElmI; 3 – pHspAI2/DriI; 4 – HspAI2/DriI + ElmI; 5 – pMHaelll/DriI; 6 – pMHaelll/DriI + ElmI; 7 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb; 8 – pFsp4HI3/DriI; 9 – pFsp4HI3/DriI + ElmI; 10 – pFsp4HI3/DriI + BisI; 11 – pHspAI4; 12 – pHspAI4 + ElmI

Из рис. 3 видно, что ElmI расщепляет ДНК pFsp4HI3/DriI (дорожка 9), образуя фрагменты ДНК такой же длины, как и после обработки этого же субстрата BisI (дорожка 10). Поскольку в этой плазмиде C5-метилированы все первые цитозины в последовательностях 5'-GCNGC-3' [4], и все они расщепляются MD-эндонуклеазой BisI, то данный факт свидетельствует о том, что ElmI узнает и расщепляет эти же метилированные сайты. Важно также, что ElmI расщепляет плазмиду pHspAI4 со значительно меньшей эффективностью, образуя два слабых фрагмента (дорожка 12). Это является следствием того, что указанный выше гиперметилированный участок плазмиды pHspAI4 включает уникальную последовательность 5'-GCNGC-3', у которой метилированы уже не внутренние (первые) цитозины на обеих цепях, как в плазмиде pFsp4HI3, а внешние (вторые).

Полученные данные означают, что ElmI узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', содержащую два остатка 5-метилцитозина, причем на порядок более эффективно, если метилированы два внутренних остатка цитозина на обеих цепях, чем при метилировании только двух внешних цитозинов.

Для того чтобы узнать, насколько эффективно ElmI расщепляет последовательности 5'-GCNGC-3' с большим количеством остатков 5-метилцитозина, pFsp4HI3/DriI обрабатывали ElmI в количестве, недостаточном для полного гидролиза, и сравнивали с картиной расщепления препаратом эндонуклеазы BisI (рис. 4).

Плазмиды pFsp4HI3 содержат две последовательности 5'-GCNGCNGC-3' и одну 5'-GCNGCNGCNGC-3', в которые входят два и три соответственно пересекающихся сайта узнавания метилазы Fsp4HI. В результате метилирования этих последовательностей метилазой Fsp4HI образуются последовательности 5'-GCNGC-3' с тремя 5-метилцитозинами, в случае 5'-GCNGCNGCNGC-3' центральный сайт 5'-GCNGC-3' будет содержать уже четыре таких остатка. Анализ нуклеотидной последовательности плазмиды pFsp4HI3, проведенный с помощью программы Vector NTI Suite 7, показывает, что при расщеплении pFsp4HI3/DriI только по этим последовательностям, а также по сайту узнавания эндонуклеазы DriI, используемой для линеаризации плазмиды, должны образоваться фрагменты длиной ~3000, ~490 (двойной фрагмент) и ~340 п.н. Как видно из рис. 4, эти фрагменты хорошо визуализируются при использовании 2–6 разведений ElmI (дорожки 2–5). Даже в последнем (дорожка 8) разведении фермента хорошо визуализируется фрагмент длиной ~1300 п.н., который должен образоваться при расщеплении уникальной гиперметилированной



**Рис. 4.** Неполное расщепление pFsp4HI3/Dril, показывающее более высокую активность ElmI на последовательностях 5'-GCNGC-3' с тремя или четырьмя 5-метилцитозинами по сравнению с 5'-GCNGC-3', содержащими лишь два 5-метилцитозина, которые предпочтительно расщепляются BisI. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1–8 – pFsp4HI3/Dril, обработанная последовательными разведениями ElmI (исходное количество, добавленное в реакционную смесь, – 1 ед. акт.) в 2 раза; 9 – маркер молекулярной массы (ДНК 1 kb); 10–17 – pFsp4HI3/Dril, обработанная последовательными разведениями BisI (исходное количество, добавленное в реакционную смесь, – 1 ед. акт.) в 2 раза; 18 – pFsp4HI3/Dril

последовательности 5'-GCNGCNGCNGC-3', содержащей в том числе сайт 5'-GCNGC-3' с четырьмя остатками 5-метилцитозина.

В случае же BisI эти фрагменты визуализируются намного хуже. Несмотря на то что во 2–4 разведениях гидролиз плазмиды pFsp4HI3/Dril намного глубже по сравнению с ElmI, в последнем (восьмом) разведении BisI мы уже практически не видим фрагмент длиной ~1300 п.н. (дорожка 17).

Полученные данные говорят о том, что, в отличие от BisI, новая MD-эндонуклеаза ElmI расщепляет варианты последовательности 5'-GCNGC-3' с тремя или четырьмя 5-метилцитозинами на порядок лучше, чем в случае, когда таких метилированных остатков только два. Поэтому даже при использовании 1/16 ед. акт. препарата ElmI (дорожка 5) исходная ДНК полностью отсутствует благодаря более эффективному расщеплению 5'-GCNGC-3' с тремя или четырьмя остатками 5-метилцитозина. Напротив, BisI расщепляет такие гиперметилированные варианты менее эффективно, поэтому при использовании 1/16

ед. акт. препарата исходный фрагмент ДНК уже визуализируется (дорожка 14).

#### Определение позиции гидролиза ДНК в сайте узнавания ElmI

Места гидролиза ДНК ElmI определяли, сравнивая длины фрагментов, образуемых при расщеплении MD-эндонуклеазами ElmI, PkrI и GluI (последняя также узнает метилированную последовательность 5'-GCNGC-3' [4] и расщепляет ее подобно BisI перед центральным нуклеотидом) олигонуклеотидного дуплекса D1/D2, образованного из олигонуклеотидов D1 и D2 (предполагаемая узнаваемая ElmI последовательность подчеркнута):

D1: 5'-GAGTTTAG(5mC)GG(m5C)TATCGATCC-3'

D2: 5'-GGATCGATAG(5mC)CG(m5)-CTAAACTC-3'.

На рис. 5 приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления радиоактивно меченного дуплекса D1\*/D2 в 20% полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.



**Рис. 5.** Определение позиции гидролиза ДНК MD-эндонуклеазой *ElmI* на олигонуклеотидном дуплексе D1/D2. Дорожки: 1 – D1\*/D2; 2 – D1\*/D2 + *PkrI*; 3 – D1\*/D2 + *ElmI*; 4 – D1\*/D2 + *GluI*. Символом «\*» обозначена меченая цепь. Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной

Как видно из рис. 5, фрагменты, образованные в результате гидролиза ферментами *PkrI* и *ElmI* (дорожки 2 и 3 соответственно) дуплекса D1\*/D2, имеют разную электрофоретическую подвижность, что свидетельствует о том, что эти ферменты имеют разные позиции гидролиза относительно сайта узнавания. В то же время электрофоретическая подвижность фрагментов ДНК, образованных при гидролизе *ElmI* и *GluI*, одинакова (дорожки 3 и 4 соответственно). Таким образом, *ElmI* и *GluI* имеют одинаковую гидролизуемую позицию относительно узнаваемой последовательности 5'-GCNGC-3'. Так как *GluI* расщепляет последовательность 5'-GC<sup>^</sup>NGC-3' перед центральным нуклеотидом «N» [4], то и *ElmI* также расщепляет ее перед центральным нуклеотидом.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые обнаруженная в энтеробактерии рекомбинантная MD-эндонуклеаза *ElmI* узнает нуклеотидную последовательность 5'-GC<sup>^</sup>NGC-3' и расщепляет обе цепи ДНК перед центральным нуклеотидом «N» с образованием 5'-выступающих однонуклеотидных концов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что геномы энтеробактерий содержат гены MD-

эндонуклеаз, аминокислотные последовательности которых имеют умеренную гомологию с *BisI*, причем лишь примерно половина аминокислотных остатков может рассматриваться как близких по физико-химическим свойствам. Тем не менее, несмотря на умеренную гомологию первичной структуры, сайты узнавания и позиции гидролиза ферментами *BisI* и *ElmI* в значительной мере схожи.

Стоит отметить, что с использованием пары праймеров *Esp-1* и *Esp-2* можно амплифицировать высокоомологичный гену *elmI* фрагмент ДНК ~430 п.н. из лабораторного штамма *E. coli* BL21(DE3) (ACT43858). Согласно базе данных GenBank этот фрагмент представляет собой рамку трансляции, которая кодирует полипептид с неизвестной функцией: Enterobact1 – WP\_001276099.1 hypothetical protein [*Escherichia coli*] >ref|YP\_003035796.1| hypothetical protein ECBD\_1551 [*Escherichia coli* 'BL21]. Однако, по нашим данным, эта рамка считывания представляет собой ген, кодирующий метилзависимую ДНК-эндонуклеазу. Мы обозначили ген, соответствующий этой рамке, как *ecoBLLI*, а кодируемый им белок – *EcoBLLI*. Его свойствам будет посвящена отдельная публикация.

Сайт-специфическая эндонуклеаза *ElmI* может быть использована в эпигенетических исследованиях, молекулярной биологии и генной инженерии для сайт-специфического расщепления метилированной ДНК, в том числе и для анализа статуса метилирования геномной ДНК растений [13], CNG-метилирование у которых считается эпигенетически важным. ●

*Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по соглашению № 14.576.21.0075 от 06.11.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI57614X0075), заключенному в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 1. С. 28–33.
2. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2011. Т. 7. № 3. С. 35–42.
3. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. // Биотехнология. 2005. № 3. С. 22–26.
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 2. С. 13–17.
5. Manual of methods for general bacteriology / Edited by Gerhard P. Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol., 1981. 524 p.

6. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. // *Gene*. 1988. V. 68. P. 139–149.
7. Xu S.-Y., Boitano M., Clark T.A., Vincze T., Fomenkov A., Kumar S., Too P.H.-M., Gonchar D., Degtyarev S.Kh., Roberts R.J. // *Genome A*. 2015. V. 3. Issue 3. e00395–159.
8. *Bergey's manual of determinative bacteriology* / Ed. Holt J.G. et al. 9th ed. Baltimore: Williams and Williams, 1993. 787 p.
9. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. // *Meth. Enzymol*. 1996. V. 266. P. 131–141.
10. Чернухин В.А., Килева Е.В., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Гончар Д.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2011. Т. 7. № 1. С. 14–20.
11. Чернухин В.А., Беличенко О.А., Тарасова Г.В., Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. Патент RU 2399663, Россия, C12N1/21, C12R1/06, 2009.
12. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2012. Т. 8. № 1. С. 16–26.
13. Vanyushin V.F. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2006. V. 301. P. 67–122.

## 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](http://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  $\mu\text{M}$ ; 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:

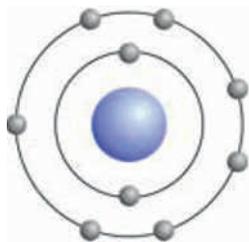
Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

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](mailto:vera.knorre@gmail.com), [actanaturae@gmail.com](mailto:actanaturae@gmail.com), телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.**



**МОСКВА**

# F-2016



1906–1990

## **XI ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ с международным участием «ХИМИЯ ФТОРА»**

посвящается 110-летию со дня  
рождения академика И. Л. Кнунянца

*Уважаемые коллеги!*

**ОРГКОМИТЕТ ПРИГЛАШАЕТ ВАС ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ В РАБОТЕ КОНФЕРЕНЦИИ**

Конференция состоится 26–30 июня 2016 г. в Москве в Институте элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук (Россия, Москва, ул. Вавилова, 28).

**ЦЕЛЬ** конференции – обсуждение достижений и актуальных проблем развития химии фторсодержащих соединений, выявление приоритетных направлений исследований, развитие научных и коммерческих контактов научно-исследовательских институтов и вузов с промышленными предприятиями

**НАУЧНАЯ ПРОГРАММА** конференции охватывает все важнейшие аспекты и общемировые тенденции развития химии и технологии соединений фтора: *синтез и реакционная способность органических и неорганических соединений фтора; биологически активные фторсодержащие вещества для медицины и сельского хозяйства; фторполимеры; проблемы технологии и перспективы использования фторсодержащих веществ и материалов.*

Программа включает доклады ведущих ученых о последних достижениях в химии органических и неорганических соединений фтора, о результатах исследований, которые открывают путь к созданию новых технологий. Планируется проведение круглых столов с представителями промышленности и бизнес-сообщества.

Получить дополнительную информацию можно на сайте конференции <http://fluorine.moscow/>, и по телефону +7(499)135-6994

**ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:** ИНЭОС РАН, ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ РАН, ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РФ, РФФИ, АНО НИЦ ИНЭОС, ЗАО НПО «ПИМ-ИНВЕСТ»

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».

