

Acta Naturae

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

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

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

ПОДПИСКА В РЕДАКЦИИ:

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

ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

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

ИНФОРМНАУКА
Индекс: 59881
www.informnauka.com

ИНТЕР-ПОЧТА
Индекс: 17510
www.interpochta.ru

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

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



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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ

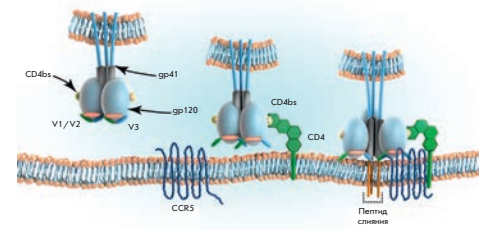


Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

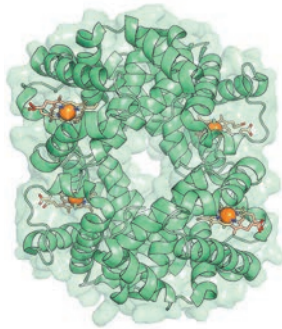
*"На мобильных устройствах с диагональю менее 7"
загружается облегченная версия сайта*

Антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1, – новая грань иммунной системы

Д. Н. Щербаков, А. Ю. Бакулина, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичев
Широконейтрализующие антитела bNAbs отличаются от обычных антител высоким уровнем соматических мутаций и необычно протяженными вариабельными петлями, что обеспечивает им возможность связываться с консервативными, но малодоступными районами Env ВИЧ-1. Представленный обзор посвящен описанию широконейтрализующих антител против ВИЧ-1, классифицированных по их взаимодействию с районами уязвимости на поверхности гликопротеинов вируса.



Этапы взаимодействия тримера Env с клеточной мембраной



Трёхмерная структура гемоглобина человека

Изучение функциональных и аллостерических сайтов в суперсемействах белков

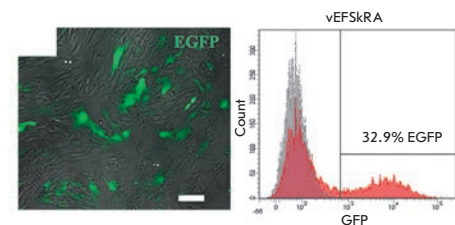
Д. А. Суплатов, В. К. Швядас

Методы компьютерной биологии, биоинформатики и молекулярного моделирования позволяют изучать особенности структурной организации функциональных и аллостерических сайтов в белках, вести поиск новых сайтов и исследовать молекулярные механизмы аллостерии. Открытие новых функциональных, аллостерических, регуляторных сайтов и установление эволюционных взаимосвязей между ними должны помочь лучше понять роль структуры в проявлении функции и обеспечении регуляции, представить новые возможности для создания лекарственных средств и дизайна эффективных биокатализаторов.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки гибридов полёвок *Microtus levis* × *Microtus arvalis*: условия, необходимые для получения и поддержания

Е. В. Григорьева, А. И. Шевченко, С. П. Медведев, Н. А. Мазурок, А. И. Железова, С. М. Закиян

Получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) гибридов от скрещивания двух видов *Microtus levis* × *Microtus arvalis* из группы обыкновенных полёвок, объекта исследования молекулярно-генетической организации генома и механизмов процесса инактивации X-хромосомы. Поддержание недифференцированного состояния в линиях ИПСК обыкновенных полёвок обеспечивается за счет активации собственных плюрипотентности: *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Sall4*, *Esrrb*.



Получение и характеристика ИПСК гибридов обыкновенных полёвок *M. levis* × *M. arvalis*

Acta Naturae

ТОМ 7, № 4 (27), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2015

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 (Ганнау-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: С.Б. Невская
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректура: 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, 2015

Номер подписан в печать 13 ноября 2015 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МИГ ПРИНТ»

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России.

Смотрите страницу на сайте ВАК:
http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.000

СОДЕРЖАНИЕ

ФОРУМ

А. Н. Петров, Н. Г. Куракова

Оценка объемов средств государственной под-
держки развития биомедицинских технологий
в России и США 6

ОБЗОРЫ

Д. Н. Щербаков, А. Ю. Бакулина, Л. И. Карпенко,
А. А. Ильичев

Антитела, нейтрализующие широкий
спектр изолятов ВИЧ-1, — новая грань
иммунной системы 14

Ф. И. Плетнёв, И. А. Остерман, А. А. Богданов,
О. А. Донцова, П. В. Сергиев

Правила выживания: *Escherichia coli*
в стационарной фазе 26

Д. А. Суплатов, В. К. Швядас

Изучение функциональных и аллостерических
сайтов в суперсемействах белков 39

Т. В. Виноградова, И. П. Чернов, Г. С. Монастырская,
Л. Г. Кондратьева, Е. Д. Свездлов

Раковые стволовые клетки: пластичность против
терапии 53

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е. В. Григорьева, А. И. Шевченко, С. П. Медведев,
Н. А. Мазурок, А. И. Железова, С. М. Закиян

**Индукцированные плюрипотентные стволовые
клетки гибридов полёвок *Microtus levis* × *Microtus
arvalis*: условия, необходимые для получения
и поддержания** 64

С. С. Ефимова, О. С. Остроумова

**Модификаторы дипольного потенциала
липидных бислоев** 79

О. С. Петракова, В. В. Ашапкин, В. Ю. Штратникова,
Л. И. Кутуева, Е. А. Воротеляк, М. А. Борисов,
В. В. Терских, И. Г. Гвазава, А. В. Васильев

**Вальпроевая кислота может увеличивать
потенциал гепатоцитарной дифференцировки
клеток слюнной железы.** 89

Е. А. Соколова, О. А. Стрёмовский, Т. А. Здобнова,
И. В. Балалаева, С. М. Деев

**Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40
для таргетной терапии HER2-положительных
опухолей.** 103

М. В. Тихонов, Н. Б. Гасанов, П. Г. Георгиев,
О. Г. Максименко

**Модельная система в клетках S2
для тестирования функциональной активности
инсуляторов дрозофилы** 108

Г. Ю. Фисунов, Д. В. Евсютина, А. А. Арзамасов,
И. О. Бутенко, В. М. Говорун

**Профилирование рибосом
Mycoplasma gallisepticum.** 118

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

Аттенуация вируса осповакцины 125

А. С. Кузнецов, П. Е. Вольнский, Р. Г. Ефремов

**Роль липидного окружения в процессе димериза-
ции трансмембранных доменов гликофорина A** 135

Н. В. Ануфриева, Е. А. Морозова, В. В. Куликова,
Н. П. Бажулина, И. В. Манухов, Д. И. Дёгтев,
Е. Ю. Гнучих, А. Н. Родионов, Г. Б. Завильгельский,
Т. В. Демидкина

**Сульфоксиды — аналоги L-метионина и L-цистеина
как пролекарства против грамположительных
и грамотрицательных бактерий** 141

С. С. Терехов, И. В. Смирнов, О. Г. Шамборант,
Т. В. Бобик, Д. Г. Илюшин, А. Н. Мурашев,
И. А. Дьяченко, В. А. Паликов, В. Д. Кнорре,
А. А. Белогулов, Н. А. Пономаренко, Е. С. Кузина,
Д. Д. Генкин, Р. Masson, А. Г. Габибов

**Химическое полисиалирование и *in vivo*
тетрамеризация улучшают фармакокинетические
характеристики биологических антител
на основе рекомбинантной
бутирилхолинэстеразы человека.** 149

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Д. А. Бабков, М. П. Парамонова, А. А. Озеров,
А. Л. Хандажинская, R. Snoeck, G. Andrei,
М. С. Новиков

**2-(2,4-Диокси-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-1-ил)-
N-(4-феноксифенил)ацетамиды как новый класс
ингибиторов репликации цитомегаловируса** ... 155

Е. В. Коновалова, О. М. Лопачева, И. А. Гривенников,
О. С. Лебедева, Э. Б. Дашинамаев⁴, Л. Г. Хаспеков,
Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин

**Мутации в гене *PARK2*, ассоциированном
с болезнью Паркинсона, сопровождаются
разбалансировкой систем программируемой
клеточной гибели** 159

Правила для авторов 163

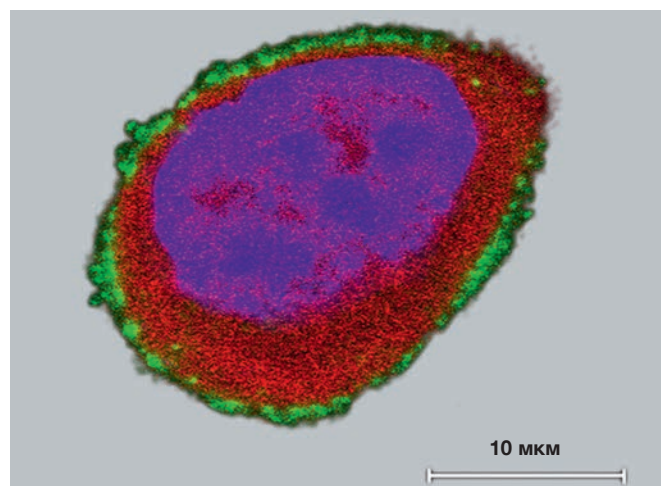


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Клетка аденокарциномы яичника человека, экспрессирующая красный флуоресцентный белок. (См. статью Соколовой и др.)

УДК 12.41

Оценка объемов средств государственной поддержки развития биомедицинских технологий в России и США

А. Н. Петров*, Н. Г. Куракова

ФГБНУ «Дирекция НТП» Минобрнауки России, 123557, Москва, Пресненский вал, 19, стр. 1

*E-mail: petrov@fcntp.ru

Базовое финансирование 27 исследовательских центров, входящих в Национальные институты здоровья США, в 2014 г. в 173 раза превосходило объемы финансирования 104 медицинских научно-исследовательских институтов, подведомственных Минздраву России и ФАНО. Вклад промышленного сектора США в создание технологий и рыночных продуктов для здравоохранения в 2014 г. оценивался в 92.6 млрд долл. А в России почти половина (45%) бюджетных средств ФЦП «ФАРМА-2020» были направлены на развитие корпоративного сектора ИиР. Президент РФ призывает обеспечить разработку передовых медицинских технологий «в полном объеме». О каком объеме средств в таком случае должна идти речь? В статье предложен ответ на этот вопрос

В фокусе современной научно-технологической политики находится задача радикального повышения эффективности использования средств федерального бюджета, выделяемого на гражданскую науку и, в первую очередь, на развитие ее приоритетных направлений. Так, на заседании Совета по науке и образованию, состоявшемся 25 июня 2015 г., Президент РФ отметил, что сложившаяся система бюджетного планирования в сфере науки и научных исследований «очень размыта в отсутствии единых внятных критериев результативности использования ресурсов».

Одновременно Президентом поставлена задача выбрать несколько приоритетов и «обеспечить их финансированием в полном объеме», а в числе ключевых приоритетов Президент назвал «передовые медицинские технологии» [1].

Целью настоящего исследования были оценка и сопоставление с другими странами объемов средств государственной поддержки, выделяемых в Российской Федерации на развитие биомедицинских технологий в рамках приоритетного направления «Науки о жизни».

ОЦЕНКА ДОЛИ ВНУТРЕННИХ ЗАТРАТ РФ В ОБЩЕМИРОВОМ БЮДЖЕТЕ НА ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ

Совокупный мировой бюджет на исследования и разработки (ИиР) в 2014 г. оценивался в 1.6 трлн долл. [2]. Самые значительные средства на научные исследования были выделены в США (31.1% от общемирового бюджета на ИиР), в Китае (17.5%), Японии (10.2%), а также в странах ЕС (21.7%), из которых только вклад Германии оценивается в 5.7%. На долю перечисленных

стран пришлось 78% мирового бюджета в 2014 г.

Доля внутренних затрат России на ИиР в 2014 г. составила 2.5% мирового бюджета (40 из 1618 млрд долл.) [3]. Согласно ФЗ «О федеральном бюджете на 2015 год и на плановый период 2016 и 2017 годов» [4], в 2016 г. предусмотрено выделение на научные ИиР 315.08 млрд руб., что с учетом текущего курса национальной валюты (60 руб. за доллар США) позволяет оценивать объем финансирования отечественного сектора ИиР из средств государственного бюджета в 2016 г. максимум в 5.3 млрд долл.

В феврале 2015 г. Президент США при обсуждении бюджета на ИиР 2016 г. в качестве ответа на увеличение бюджетов на ИиР азиатских стран за последние 5 лет, превышающие соответствующие темпы США, предложил «положить конец

бюджетному аскетизму» и запланировать 6%-ное увеличение государственного бюджета на ИиР в 2016 г. [5]. Таким образом, ожидается, что объем средств государственного бюджета США, направленного на развитие сектора гражданской науки, будет составлять более 62 млрд долл., т.е. почти в 12 раз превосходить аналогичный показатель в бюджете РФ. При этом следует отметить, что доля государственного бюджета, выделяемая на гражданскую науку, в 2015 г. в США составляет 1.7%, а в РФ – 2%.

Рассмотрим, какой объем финансирования считается достаточным для развития медицинских технологий в рамках такого приоритетного направления, как науки о жизни, с позиций распорядителей государственного бюджета в России и США.

ОБЪЕМЫ ФИНАНСИРОВАНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОТДЕЛЬНЫХ КЛЮЧЕВЫХ НАПРАВЛЕНИЙ В РОССИИ И США

Выполненный нами анализ планируемых объемов финансирования показывает особую приоритетность биомедицинских программ исследований в США. В целом и без того значительное финансирование Национальных институтов здоровья США (в состав которых входят 27 исследовательских центров), составляющее в 2015 г. 30.2 млрд долл., будет увеличено в 2016 г. на 1 млрд долл. Наряду с этим из бюджета Национального научного фонда, который также планируется увеличить до 7.72 млрд долл. (что на 5.2% больше бюджета 2015 г.), предусмотрено увеличение финансирования программы «Понимание мозга» (одного из подпроектов Инициативы Brain) на 35.2% по сравнению с бюджетом 2015 г.

В Российской Федерации аналогом Национальных институтов

здоровья США является кластер медицинских институтов, из которых 50 входят в ФАНО (ранее в Российскую академию медицинских наук), а 54 НИИ подведомственны Минздраву России. Совокупный бюджет базового и проектного финансирования этих организаций определен Государственной программой развития здравоохранения Российской Федерации (подпрограммой 3) [6] и составляет в 2015 г. 11.8 млрд руб., что с учетом текущего курса национальной валюты (60 руб. за доллар США) соответствует 0.20 млрд долл. США.

В 2016 г. разрыв в объемах финансирования двух сходных по спектру выполняемых в них исследований референтных групп институтов еще более возрастет, поскольку в США запланировано увеличение финансирования Национальных институтов здоровья, а в РФ, напротив, сокращение объемов средств, выделяемых в целом на развитие гражданской науки и на сектор биомедицинских исследований в частности.

Столь же многократно отличаются и объемы финансирования отдельных ключевых направлений биомедицинских исследований в США и России.

Так, в США в 2016 г. до 1.2 млрд долл. планируется увеличить финансирование программы по изучению механизмов антибиотикорезистентности, обеспечив почти двукратное увеличение бюджета этого приоритета по сравнению с 2015 г. Более чем в 2 раза вырастет в 2016 г. финансовое обеспечение инициативы «Инновационные технологии для исследований мозга»: с 64 млн долл. в 2015 г. до 136 млн долл. в 2016 г. Национальная программа исследований детских заболеваний, имеющая ежегодный объем финансирования 1.2 млрд долл. в 2014–2016 гг., в 2016 г. по-

лучит дополнительные средства (165 млн долл.) на оценку влияния окружающей среды на здоровье детей [5]. Для развития персонифицированной медицины выделяется 215 млн долл. на новую «Инициативу высокоточной медицины», в рамках которой будет создаваться единая база данных показателей здоровья и генетических анализов миллиона волонтеров. На программу исследований новых природных очаговых инфекций выделены 699 млн долл.

В РФ конкурсное и программное финансирование фундаментальных, поисковых и прикладных проектов биомедицинской тематики в 2015 г. осуществлялось за счет средств нескольких государственных фондов, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (далее – ФЦП «ИиР»), ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (далее – ФЦП «ФАРМА-2020»).

В *таблице* приведены выделенные и планируемые объемы средств федерального бюджета на развитие фундаментальной, трансляционной и персонализированной медицины, а также поддержку некоторых приоритетных направлений в области наук о жизни в России и США в 2014–2016 гг. Следует подчеркнуть, что перечень ключевых распорядителей бюджета на биомедицинские ИиР как в РФ, так и в США не является исчерпывающим по причине отсутствия данных.

Приведенные данные показывают абсолютную несопоставимость бюджетов, выделяемых в России и США на фундаментальные, поисковые и прикладные исследования в области биомедицины, а также на приоритетную

Объемы финансирования биомедицинских исследований и отдельных приоритетов в области наук о жизни в США и России в 2014–2016 гг.

США	Российская Федерация
Средства федерального бюджета, выделенные на развитие фундаментальной, трансляционной и персонализированной медицины	
2015 г.: Службы здравоохранения, включая Национальные институты здоровья (27 исследовательских центров) – 30.2 млрд долл. ^а	2015 г.: Минздрав России (54 НИИ) – 1.566 млрд руб. – <i>фундаментальные исследования</i> ^б 2015 г.: ФАНО (50 НИИ) – 5.976 млрд руб. – <i>фундаментальные исследования</i> ^б 2015 г.: Минздрав России (54 НИИ) – 3.195 млрд руб. – <i>прикладные исследования</i> ^б 2015 г.: Минздрав России (63 государственные медицинские академии) – 1.110 млрд руб. – <i>прикладные исследования</i> ^б 2015 г.: Российский научный фонд – 3.8 млрд руб. – <i>фундаментальные и поисковые исследования в области биомедицины</i> ^в 2015 г.: ФЦП «Исследования и разработки» – 1.6 млрд руб. – <i>прикладные исследования и экспериментальные разработки в области биомедицины</i> ^в 2015 г.: Российский фонд фундаментальных исследований – 1.6 млрд руб. – <i>фундаментальные исследования в области биомедицины</i> ^в 2015 г.: Фонд содействия развитию малых форм предприятий – 0.65 млрд руб. – <i>прикладные исследования и экспериментальные разработки в области биомедицины</i> ^в 2015 г.: Постановление Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 – 0.6 млрд руб. – <i>прикладные исследования и экспериментальные разработки в области биомедицины</i> ^в 2015 г.: Постановление Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 220 – 0.2 млрд руб. – <i>фундаментальные исследования в области биомедицины</i> ^в ФЦП «ФАРМА-2020» – 12.8 млрд руб., из них 1.936 млрд руб. на финансирование доклинических исследований ^в
Бюджет на НИОКР индустриального сектора «Наук о жизни»	
2014 г.: – 92.6 млрд долл. ^а	Вклад бюджетов промышленных компаний РФ в совокупный национальный бюджет на ИиР не превышает 12% в течение 2012–2014 гг. ^а
ИТОГО 123.7 млрд долл.	ИТОГО 33.1 млрд руб. = 0.6 млрд долл.
Объем финансирования программ по некоторым приоритетным направлениям биомедицинских исследований	
Программа по изучению механизмов антибиотикорезистентности: 2015 г.: 0.6 млрд долл. 2016 г.: 1.2 млрд долл.	РНФ Конкурс «Новые подходы к борьбе с инфекционными заболеваниями» 2015 г.: 0.1 млн долл. в год (6 млн руб. в год) ^д
Инициатива «Инновационные технологии исследования мозга»: 2015 г.: 64 млн долл. ^а 2015 г.: 136 млн долл. ^а <u>Национальная программа детских исследований</u> : 1.2 млрд долл. в 2015 г. ^а +165 млн долл. на исследование влияния окружающей среды на здоровье детей в 2016 г. ^а	2014 г.: Специальная программа РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» 3.3 млн долл. в год (200 млн руб. в год или 1–4 млн руб. на проект) ^е

Источники:

^аThe 2015 Budget: Science, Technology, and Innovation for Opportunity and Growth [7].

^бГосударственная программа развития здравоохранения Российской Федерации [6].

^в2014 Global R&D Funding Forecast [2].

^гДоклад начальника отдела Департамента науки и технологий Минобрнауки России Ильи Казеева [8].

^дПубличный аналитический доклад «Биомедицина» [9].

^еАналитический отчет «Ежегодный мониторинг средств, выделенных на финансирование НИОКР (в том числе по приоритетным направлениям инновационного развития)» [3].

поддержку наиболее перспективных и социально значимых направлений.

Обращает на себя внимание и крайне низкий объем финансирования научной деятельности в медицинских вузах: для проведения прикладных исследований 63 медицинским вузам, подведомственным Минздраву России, выделены всего 1.110 млрд руб., или 18.5 млн долл.

Еще более несопоставимыми выглядят объемы финансирования проектов, посвященных решению тематически идентичных проблем в области наук о жизни, например, расшифровке механизма антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов. В США на финансирование программы по антибиотикоустойчивости в 2015 г. было выделено 0.6 млрд долл., а в 2016 г. плановый объем средств федерального бюджета увеличен вдвое и составит 1.2 млрд долл. В России в рамках финансирования исследований Российским научным фондом в 2014 г. объявлен ежегодный конкурс «Новые подходы к борьбе с инфекционными заболеваниями». Было выделено 63 гранта до 6 млн руб. в год, что эквивалентно примерно 6.3 млн долл. в год. Таким образом, различие в объемах финансирования сходных приоритетов в области биомедицины достигает в США и РФ сотни раз!

ОБЪЕМ ИНВЕСТИЦИЙ НА БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИИР ПРОМЫШЛЕННОГО СЕКТОРА США И РФ

Отдельного обсуждения заслуживает оценка вклада национальных секторов промышленности, ориентированных на создание технологий и рыночных продуктов для здравоохранения, в развитие биомедицинских исследований и разработок. На долю бюджетов на НИОКР, ежегодно выделяемых

промышленными компаниями США, продукция которых определена как «индустрия наук о жизни», приходится почти половина общемировых корпоративных бюджетов в области наук о жизни. В 2014 г. этот показатель составил 92.6 млрд долл. из 201.3 млрд долл. мирового бюджета корпоративных ИиР «Индустрия наук о жизни». Интересно отметить, что этот почти 50%-ный вклад биомедицинского промышленного сектора США сохраняется в течение последних пяти лет, и еще в 2011 г. оценивался 84.5 от 184.2 млрд долл. общемирового бюджета, т.е. в 46% [2].

Как результат, в консолидированном бюджете США на фундаментальные и прикладные исследования в области биомедицины в 2014 г. соотношение средств государственного бюджета и промышленного сектора составило примерно 3 к 1 (32 млрд долл. – бюджет Национальной службы здоровья, включая Национальные институты здоровья США; 92.6 млрд долл. – вклад корпоративных бюджетов промышленных компаний на ИиР в области наук о жизни) [2].

Информацию об объемах инвестиций собственных средств промышленных компаний РФ в разработку лекарственных препаратов и медицинского оборудования в 2014 г. обнаружить не удалось. Согласно данным «Ежегодного мониторинга средств, выделенных из федерального бюджета на финансирование НИОКР (в том числе по приоритетным направлениям инновационного развития России)», в течение последних трех лет (2011–2014 гг.) вклад бюджетов промышленных компаний РФ в совокупный национальный бюджет на ИиР не превышает 12% [3].

Однако отечественные промышленные компании активно используют средства федерального бюджета и, прежде всего,

ФЦП «ФАРМА-2020» для выполнения корпоративных НИОКР. Так, в 2015 г. средства этой федеральной программы на научные исследования были распределены в следующей пропорции: 8.64 млрд руб. на выполнение 312 проектов получили бюджетные учреждения и 7.15 млрд руб. на НИОКР были выделены 215 коммерческим компаниям. Таким образом, почти половина (45%) бюджетных средств ФЦП «ФАРМА-2020» в 2015 г. была направлена на развитие корпоративного сектора ИиР [10].

Приведенные данные дают основание отметить, что отечественный индустриальный сектор не только не является источником дополнительного и значительного по объемам финансирования исследований в области биомедицины, но и создает конкуренцию за средства федерального бюджета для проведения ИиР в этой области.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЗАТРАТ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА НА НАУКИ О ЖИЗНИ В РАЗРЕЗЕ ФИНАНСИРОВАНИЯ НИОКР ПО ПРИОРИТЕТНЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ

В общем объеме внутренних затрат на ИиР затраты федерального бюджета на поддержку приоритетных направлений составили 49% в 2010 г., 50% в 2011 г. и 56% в 2012 г. [3]. Анализ динамики затрат федерального бюджета в разрезе финансирования НИОКР по шести приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в РФ, утвержденных Указом Президента РФ от 07.02.2011 № 899 [11], показывает, что на приоритет «Науки о жизни» за 2010–2012 гг. были направлены наименьшие объемы средств федерального бюджета (рис. 1) [12].

В отличие от РФ, в США, судя по квотированию государственно-

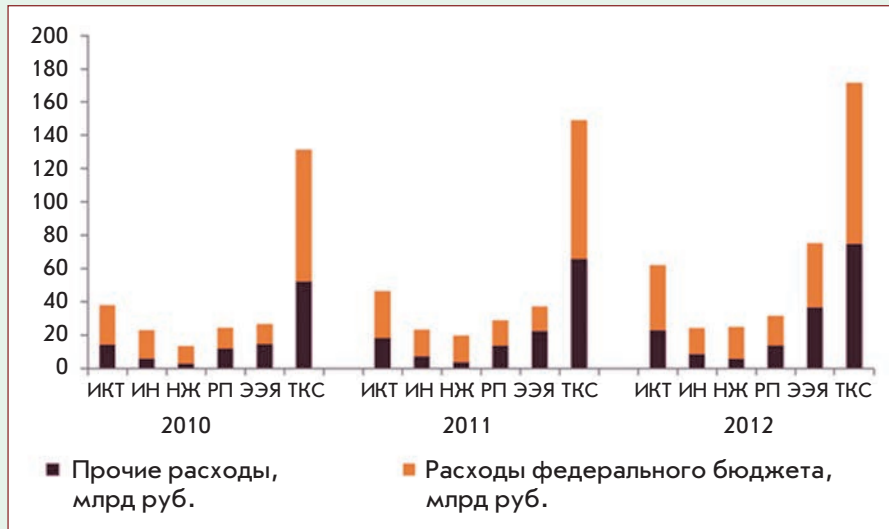


Рис. 1. Структура внутренних затрат на ИиР по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники (Источник: Индикаторы науки 2012–2014). Сокращения: ИКТ – информационно-телекоммуникационные системы; ИН – индустрия наносистем; НЖ – науки о жизни; РП – рациональное природопользование; ЭЭЯ – энергоэффективность, энергосбережение, ядерная энергетика; ТКС – транспортные и космические системы

го финансирования, науки о жизни являются одним из главных научно-технологических приоритетов страны. На рис. 2 отражен принцип распределения федерального бюджета США на ИиР между главными распорядителями средств в 2012–2014 гг. [2].

Национальные институты здоровья США получают самые значительные объемы средств по сравнению со всеми другими распорядителями бюджетов. Так, в 2014 г. из 58.8 млрд долл., выделенных на гражданский сектор науки США, Национальные институты здоровья получили более половины – 32.0 млрд долл. Неудивительно, что после 2000 г. более половины Нобелевских лауреатов в области медицины имеют аффилиацию с университетами США [2].

По данным аналитического агентства Battelle, R@D Magazine, именно США являются мировым технологическим лидером в области биомедицины. Вторая позиция

рейтинга отдана Великобритании, на третьей позиции стоит Германия, на четвертой – Япония. Китай замыкает пятерку лидеров (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно перечню поручений от 14 июля 2015 г. по итогам заседания Совета по науке и образованию [13], Администрации Президента РФ предложено определить принципы выбора приоритетов научно-технологического развития. Представляется, что в современной экономической ситуации такой выбор правильно осуществлять не только исходя из оценки социально-экономического значения того или иного научно-технологического направления для страны, но и с учетом объема средств государственного бюджета, необходимого для получения конкурентоспособных научно-технологических заделов мирового уровня.

Приведенные данные дают основание полагать, что несопоставимость внутренних затрат РФ на развитие сектора гражданской науки по сравнению с индустриально развитыми странами позволяет выделять в качестве приоритетов научно-технологического развития страны лишь ограниченное число исследовательских направлений. Только резкое ограничение приоритетов позволит «обеспечить их финансированием в полном объеме», как было отмечено Президентом РФ на Заседании по науке и образованию [1].

Когда декларируется, что приоритетом страны должны стать технологии, обеспечивающие качество жизни и, в первую очередь, передовые медицинские технологии [1], целеполагание и ожидаемые результаты реализации таких приоритетов абсолютно понятны. Однако при этом следует учитывать, что создание новых медицинских технологий является одним из самых затратных в мире научных приоритетов, и страны, претендующие на позиции технологических лидеров в этой области, выделяют на биомедицинские фундаментальные и прикладные исследования бюджеты, в сотни раз превосходящие объемы финансирования биомедицинских исследований в РФ.

Дополнительным фактором, препятствующим росту конкурентоспособности национальных биомедицинских разработок, является низкая заинтересованность промышленного отраслевого сектора в финансировании поисковых и прикладных исследований, направленных на создание новых отечественных лекарственных препаратов и медицинского оборудования. Доля бюджетов промышленных компаний «индустрии наук о жизни» достигла в 2014 г. в США 75% от общенациональных внутренних затрат на НИОКР



Рис. 2. Распределение средств федерального бюджета США между главными распорядителями бюджета в 2012–2014 гг. (Источник: 2014 Global R&D Funding Forecast)

в области биомедицины, а в абсолютном выражении инвестиции в биомедицинский НИОКР, поступившие из промышленного сектора в 2014 г., составили 92.6 млрд долл., увеличившись с 84.5 млрд долл. в 2011 г.

ВЫВОДЫ

На основании изложенного представляется целесообразным реализовать следующую совокупность мер, направленных на совершенствование механизмов финансирования биомедицинских исследований в России.

Во-первых, учитывая тот факт, что внутренние расходы РФ на ИиР составят в 2016 г. не более 2% от общемировых, с нашей точки зрения, следует отказаться от включения в число приоритетных направления исследований, дублирующие тематику крупных международных проектов, результаты которых являются общедоступными и могут быть восприняты без видимых барьеров и ограничений для использования в практике российского здравоохранения. Примерами таких проектов яв-

ляются международный проект «Протеом человека», Программа по изучению механизмов антибиотикорезистентности (США), Программа по изучению природноочаговых инфекций (США) и т.п. Предлагаемое не означает прекращения финансирования отечественных исследований по данным направлениям – речь идет лишь о нецелесообразности придания им статуса «приоритетных», что предполагает концентрацию значительных финансовых ресурсов на направлениях, которые могут развиваться в РФ путем активного использования результатов реализации крупных международных проектов.

Во-вторых, необходимо исключить избыточное дублирование финансирования (как в рамках государственного задания, так и конкурсного и программного) биомедицинских проектов сходной тематики различными распорядителями государственного бюджета на ИиР, добиваясь при этом баланса между объемами финансирования, штатной численности сотрудников НИИ и числа директивных и конкурсных тематик.

В-третьих, поскольку основным конечным потребителем результатов фундаментальных и прикладных исследований в области биомедицины является население, за сохранение и восстановление здоровья которого ответствен Минздрав России, именно это ведомство должно осуществлять с учетом состояния здоровья населения страны определение и корректировку тематик ИиР, в том числе в рамках конкурсов государственных фондов и институтов развития.

В-четвертых, развитие биомедицинских технологий, имеющих значения для практического здравоохранения РФ, выведение научных исследований и промышленного производства в этой сфере на глобальный уровень

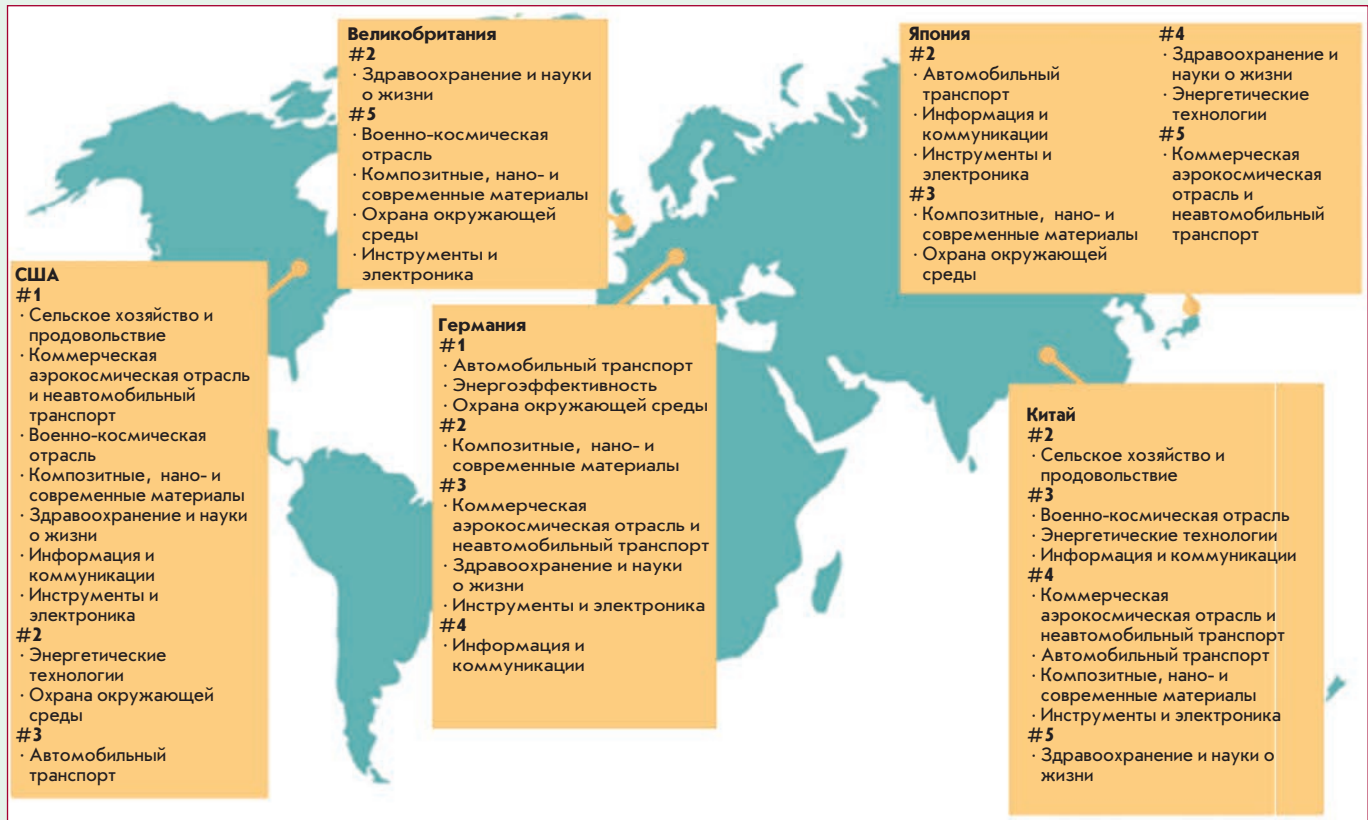


Рис. 3. Топ-5 стран – технологических лидеров в области наук о жизни (Источник: 2014 Global R&D Funding Forecast)

конкурентоспособности невозможно без активного участия крупных промышленных компаний, российских и международных. Сегодня российские фармацевтические компании и компании, производящие медицинское оборудование, практически не инвестируют в создание

научно-технологических заделов в сфере биомедицины, не внедряют разработки отечественных исследователей на действующих производствах, ссылаясь на существование регулятивных барьеров и отсутствие гарантированного спроса на продукцию со стороны Министерства здраво-

охранения РФ. В этой связи представляется необходимым усиление координации деятельности государства, научных организаций и всех участников процессов производства и потребления оборудования и лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи в РФ. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заседание Совета при Президенте РФ по науке и образованию на тему «Новые вызовы и приоритеты развития науки и технологий в Российской Федерации». Стенограмма (2015) // Официальный сайт Президента России, 24.06.2015 г. URL: <http://kremlin.ru/events/councils/by-council/6/49755>.
2. 2014: Global R&D Funding Forecast (2013). Battelle, R&D Magazine. URL: http://www.battelle.org/docs/tpp/2014_global_rd_funding_forecast.pdf.
3. Аналитический отчет «Ежегодный мониторинг средств, выделенных из федерального бюджета на финансирование НИОКР (в том числе по приоритетным направлениям инновационного развития России)» (2014) // Аналитический центр при Правительстве РФ, декабрь 2014 г., Москва. URL: <http://ac.gov.ru/files/publication/a/4889.pdf>.
4. Федеральный закон от 01.12.2014 № 384-ФЗ (ред. от 13.07.2015) «О федеральном бюджете на 2015 год и на плановый период 2016 и 2017 годов». // Интернет-портал «Российской газеты» от 5 декабря 2014 г. URL: <http://www.rg.ru/2014/12/05/budget-dok.html>
5. Investing in America's future (2014). White House Office of Science and technology policy. URL: <https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/omb/budget/fy2016/assets/investing.pdf>.
6. Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. № 294 (2014) «Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие здравоохранения» // Интернет-портал «Российской газеты» от 24 апреля 2014 г. URL: <http://www.rg.ru/2014/04/24/zdravooxr-site-dok.html>
7. The 2015 Budget: Science, Technology, and Innovation for

- Opportunity and Growth. Science, Technology, Innovation, and STEM Education in the 2015 Budget (2014). White House Office of Science and technology policy. March 2014. URL: <https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/Fy%202015%20R&D.pdf>.
8. Казеев И. Доклад начальника отдела Департамента науки и технологий Министерства образования и науки Российской Федерации (2015). Материалы Заседания Экспертного совета по здравоохранению от 05.06.2015 г. // Интернет-портал Совета Федерации Федерального Собрания Российской Федерации, 09.06.2015. URL: http://social.council.gov.ru/activity/expert_activities/56304.
 9. Публичный аналитический доклад по научно-технологическому направлению «Биомедицина» (2015). Москва. URL: <https://reestr.extech.ru/docs/analytic/reports/medicine.pdf>.
 10. Перечень контрактов на НИОКР Программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». // Интернет-портал Департамента государственных целевых программ и капитальных вложений Минэкономразвития России. URL: <http://fcp.economy.gov.ru/cgi-bin/cis/fcp.cgi/Fcp/ViewFcp/View/2015/350/>.
 11. Указ Президента РФ от 07.02.2011 № 899 (2011) «Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации» // Официальный сайт Президента России. URL: <http://kremlin.ru/acts/bank/33514>.
 12. Индикаторы науки: 2014: статистический сборник. М.: Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 2014. 400 с.
 13. Перечень поручений от 14 июля 2015 года по итогам заседания Совета по науке и образованию 24 июня 2015 года (2015) // Официальный сайт Президента России. URL: <http://kremlin.ru/acts/assignments/orders/50006>.

УДК 577.27

Антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1, – новая грань иммунной системы

Д. Н. Щербаков^{1,2*}, А. Ю. Бакулина^{1,3}, Л. И. Карпенко¹, А. А. Ильичев¹

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

²Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

³Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: scherbakov_dn@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.04.2015

РЕФЕРАТ Вирус иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1) обладает способностью уходить от адаптивного иммунного ответа благодаря высокой скорости мутирования. В первые годы после открытия ВИЧ-1 достаточно широко было распространено мнение, что протективные антитела, нейтрализующие вирус, встречаются редко или их вообще не существует. В 1990-х появились первые сообщения о том, что в сыворотках некоторых ВИЧ-1-инфицированных присутствуют антитела, способные нейтрализовать различные подтипы вируса. Такие антитела получили название широконейтрализующих (broadly neutralizing antibodies, bNAbs). С 2009 года благодаря появлению новых клеточных технологий резко выросло количество публикаций, посвященных получению bNAbs, способных нейтрализовать более 90% первичных изолятов ВИЧ-1. bNAbs отличаются от обычных антител рядом особенностей, а именно высоким уровнем соматических мутаций и необычно протяженными вариабельными петлями, что обеспечивает им возможность связываться с консервативными, но малодоступными районами Env ВИЧ-1. Представленный обзор посвящен описанию широконейтрализующих антител против ВИЧ-1, классифицированных по их взаимодействию с районами уязвимости на поверхности гликопротеинов вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, gp120, gp41, bNAbs, широконейтрализующие антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; bNAbs – антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1; Env – белок оболочки ВИЧ-1; gp – гликопротеин; CD4 – трансмембранный гликопротеин, рецептор ВИЧ-1; CD4bs – участок связывания gp120 с CD4; CCR5 – интегральный мембранный белок, рецептор хемокина типа 5, рецептор ВИЧ-1; CXCR4 – интегральный мембранный белок, рецептор хемокина типа 4, корецептор ВИЧ-1; MPER – membrane-proximal external region, околосмембранный внешний регион белка gp41; RT-PCR – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; CDR – complementarity determining region, область молекулы иммуноглобулина, определяющая ее комплементарность антигену; CDR H3 – третья вариабельная петля района тяжелой цепи антитела, определяющего комплементарность антигену.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших тенденций развития биомедицины последних лет – все увеличивающееся применение препаратов моноклональных антител. Уже более 15 лет в клиниках разных стран препараты направленного действия на основе антител успешно используются против целого ряда социально значимых заболеваний, а общее число таких препаратов достигло уже нескольких десятков. Различным аспектам создания и использования моноклональных антител посвящен ряд обзоров [1, 2]. В то же время многие грани индукции и развития гуморального иммунного ответа

до сих пор не понятны. Изучение широконейтрализующих антител (bNAbs) против ВИЧ-1 значительно расширило наши знания об антителах, но эта область продолжает стремительно развиваться.

Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вызывающий СПИД, был открыт более 30 лет назад. По данным ВОЗ, на конец 2013 года почти 78 млн человек заразились ВИЧ-1, около половины из них уже нет в живых. Безопасная и эффективная вакцина против ВИЧ-1 позволила бы приостановить, а впоследствии и ликвидировать распространение этого опасного заболевания. Основное препятствие в разработке

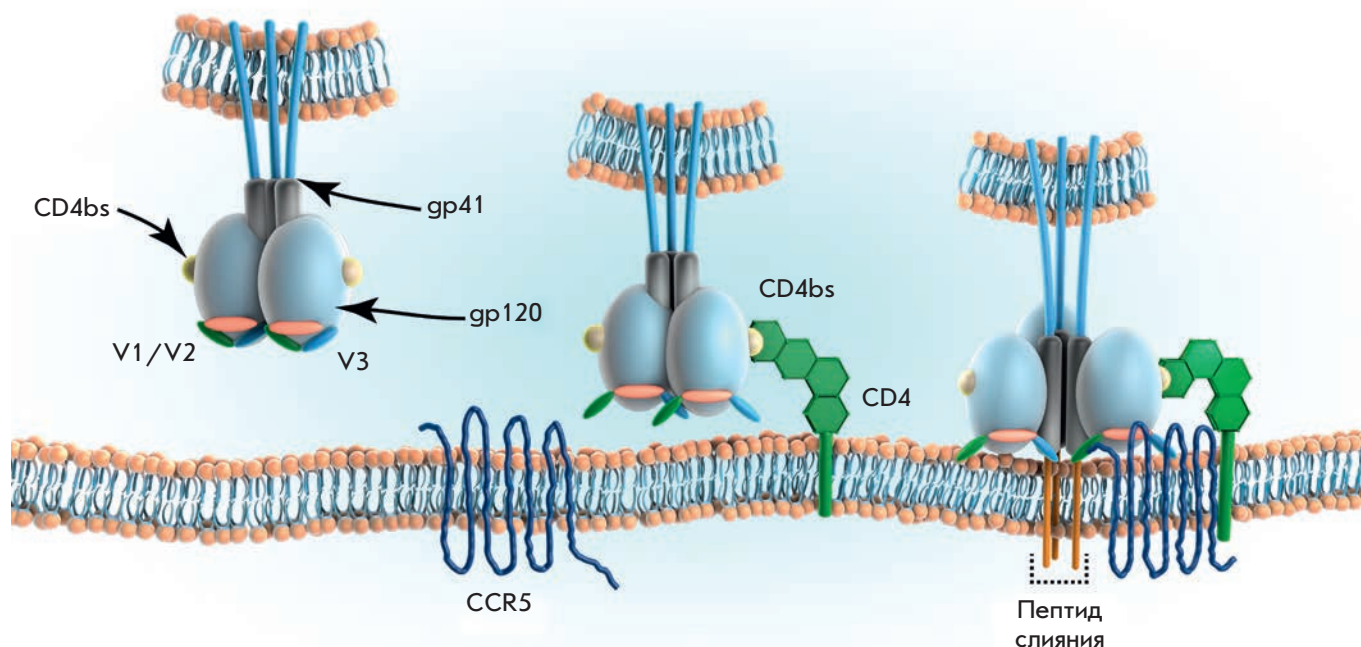


Рис. 1. Этапы взаимодействия тримера Env с клеточной мембраной. Вначале gp120 связывается с клеточным рецептором CD4, в результате открывается сайт связывания корецепторов, прежде экранированный районами V3 и V1/V2. После связывания с CCR5 или другим корецептором пептид слияния проникает в клеточную мембрану

вакцины против ВИЧ-1 – чрезвычайно высокая изменчивость вируса, что позволяет ему уходить от воздействия иммунного ответа. Так, в процессе эпидемии ВИЧ-1 эволюционировал в 9 основных подтипов и их многочисленные рекомбинантные формы [3].

До начала 1990-х годов считалось, что протективные антитела, нейтрализующие столь активно мутирующий вирус, встречаются редко или их вообще не существует. В 90-х появились первые сообщения о том, что сыворотки некоторых ВИЧ-1-инфицированных содержат антитела, способные нейтрализовать различные подтипы вируса. Эти антитела получили название широконейтрализующих (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [4]. С 2009 года благодаря появлению новых клеточных технологий резко возросло количество публикаций, посвященных получению новых bNAbs. В представленном обзоре рассмотрены bNAbs, которые позволяют по-новому взглянуть на стратегию дизайна вакцины против ВИЧ-1.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИЧ-1

Вирионы ВИЧ-1 имеют сферическую форму диаметром около 140 нм. Оболочка вируса состоит из двойного слоя липидов и пронизана гликопротеиновыми шипами. Липидная оболочка происходит из плазма-

тической мембраны клетки, в которой реплицируется вирус, а шипы представлены тримерными гликопротеиновыми комплексами, состоящими из гликозилированных белков: внешнего gp120 и трансмембранного gp41. Каждая вирусная частица содержит 70–79 таких тримеров [5]. Из всех вирусных белков только они экспонированы на поверхности вириона и поэтому служат основными мишенями для антител. Они жизненно необходимы для размножения вируса, так как обеспечивают его проникновение в клетку.

Гликопротеины gp120 и gp41 кодируются геном *env*, они называются Env и транслируются в виде единого полипротеина gp160, который тримеризуется, а затем расщепляется фурином клетки в аппарате Гольджи. Расщепление активирует тример gp120–gp41, переводя его в метастабильное состояние, готовое к конформационному переходу. Как и другие вирусные белки слияния типа I, эти тримеры связываются с клеточными рецепторами, вследствие чего претерпевают конформационные изменения, приводящие к высвобождению пептида слияния (fusion peptide) – района gp41, который проникает в клеточную мембрану и обеспечивает слияние мембран вируса и клетки (рис. 1). Известны пространственные структуры как отдельных фрагментов gp120 и gp41, так и тримера в целом; районы взаимодействия с CD4 и корецепторами картированы на gp120 [6].

ВИЧ-1 инфицирует клетки, несущие на своей поверхности рецептор CD4 и хемокиновые рецепторы, состоящие из семи трансмембранных доменов, обычно CCR5 или CXCR4. К таким клеткам относятся Т-хелперные лимфоциты (Th), макрофаги, фолликулярные дендритные клетки, клетки островков Лангерганса, клетки микроглии головного мозга. Вирус также способен инфицировать широкий спектр CD4-негативных клеток, обладающих рецепторами хемокинов: астроциты мозга, эпителий шейки матки, почек и кишечника, эндотелиальные клетки капилляров мозга и шейки матки, клетки роговицы глаза. Без CD4 аффинность связывания вируса с клеткой значительно ниже [7]. Без взаимодействия с корецепторами не происходит слияния мембран вируса и клетки, вирус поглощается клеткой путем эндоцитоза и впоследствии обычно инактивируется, а его генетический материал не попадает в цитоплазму [7].

Благодаря высокой скорости накопления мутаций изменяется аминокислотный состав белков ВИЧ-1. Однако ряд фрагментов в белках, обеспечивающих взаимодействие вируса с CD4 и CCR5, консервативен. На gp120 переменные районы (V1, V2, V3, V4, V5) чередуются с консервативными (C1, C2, C3, C4 и C5). Переменные петли стерически закрывают консервативные районы от взаимодействия с антителами [8]. Показано, что антитела в организме больных нарабатываются, в первую очередь, на переменные районы, и за счет высокой скорости накопления мутаций вирус легко уходит от этих антител [9, 10]. Еще один механизм, с помощью которого вирус скрывается от иммунного ответа, – гликозилирование. Известно, что gp120 имеет около 25 сайтов N-гликозилирования, и углеводы экранируют белковую поверхность комплекса [8]. Мутации вызывают перемещение сайтов гликозилирования gp120, что приводит к изменению антигенного портрета вируса [11]. Вирус, у которого удалили части переменных петель и некоторые сайты гликозилирования, остается жизнеспособным, но он более чувствителен к нейтрализации поликлональной сывороткой. Это заставляет предполагать, что основная функция этих районов – маскировка других регионов Env от антител [12]. Учитывая все особенности Env, полагали, что протективные антитела не могут возникнуть в процессе ВИЧ-инфекции.

Действительно, информации об антителах, способных нейтрализовать ВИЧ, в первые годы было очень мало. В связи с тем, что организм человека не способен самостоятельно сдерживать вирусную нагрузку, было принято считать, что такие антитела либо не нарабатываются, либо это происходит крайне редко [18–20]. Позже стали поступать сообщения

о ВИЧ-1-инфицированных, чьи сыворотки содержали антитела, способные нейтрализовать не только лабораторно-адаптированные штаммы, но и различные первичные изоляты вируса [21–26]. Вначале полагали, что такие широконейтрализующие антитела (bNAbs) появляются у небольшой части ВИЧ-инфицированных [20, 27]. В дальнейшем bNAbs выявили примерно у 30% носителей ВИЧ, инфицированных не менее года назад [23, 28, 29]. Совсем недавно показали, что подобные антитела можно зарегистрировать более чем у половины инфицированных [30]. При этом у 1% носителей формируются антитела, обладающие необычно высокой способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов, а также до 99% известных на сегодняшний день изолятов ВИЧ-1 [31].

Изучение свойств bNAbs и регионов ВИЧ-1, с которыми они взаимодействуют, позволяет получить не только фундаментальные знания о природе этого уникального явления, но и весьма полезно для исследований, направленных на создание вакцины.

В настоящее время выделяют пять так называемых регионов уязвимости – районов тримера gp41-gp120 ВИЧ, с которыми связываются bNAbs. В каждом из них расположено несколько перекрывающихся эпитопов различных bNAbs. Один из регионов уязвимости совпадает с участком связывания CD4 на gp120 (CD4bs – от английского CD4 binding site). Еще два региона расположены исключительно на gp120 – это район связывания антител PG9 и PG16 и область около петли V3. К таким регионам относятся также область gp41 около мембраны (MPER) и граница gp120 и gp41. Регионы уязвимости схематично изображены на *рис. 2*.

Информация об основных bNAbs представлена в *таблице*, где приведена их классификация согласно регионам связывания и хронологии открытия. Серым цветом в *таблице* выделены антитела, которые относятся к bNAbs первого поколения.

ПЕРВОЕ ПОКОЛЕНИЕ bNAbs

Хронологию открытия нейтрализующих ВИЧ-1-антител широкого спектра действия можно условно разделить на два периода. Первые сообщения об антителах с подобными характеристиками появились в начале 1990-х годов прошлого века. В их число входят IgG1b12, 2G12, 2F5, Z13 и 4E10.

Первым при помощи техники фагового дисплея получили IgG1b12, которое связывается с CD4bs – консервативным районом gp120 [4]. b12 было выделено в виде Fab-фрагмента путем селекции из иммунной фаговой библиотеки антител, полученной из костного мозга ВИЧ-инфицированного нон-прогрессора. Сочетание тяжелой и легкой частей этого антитела

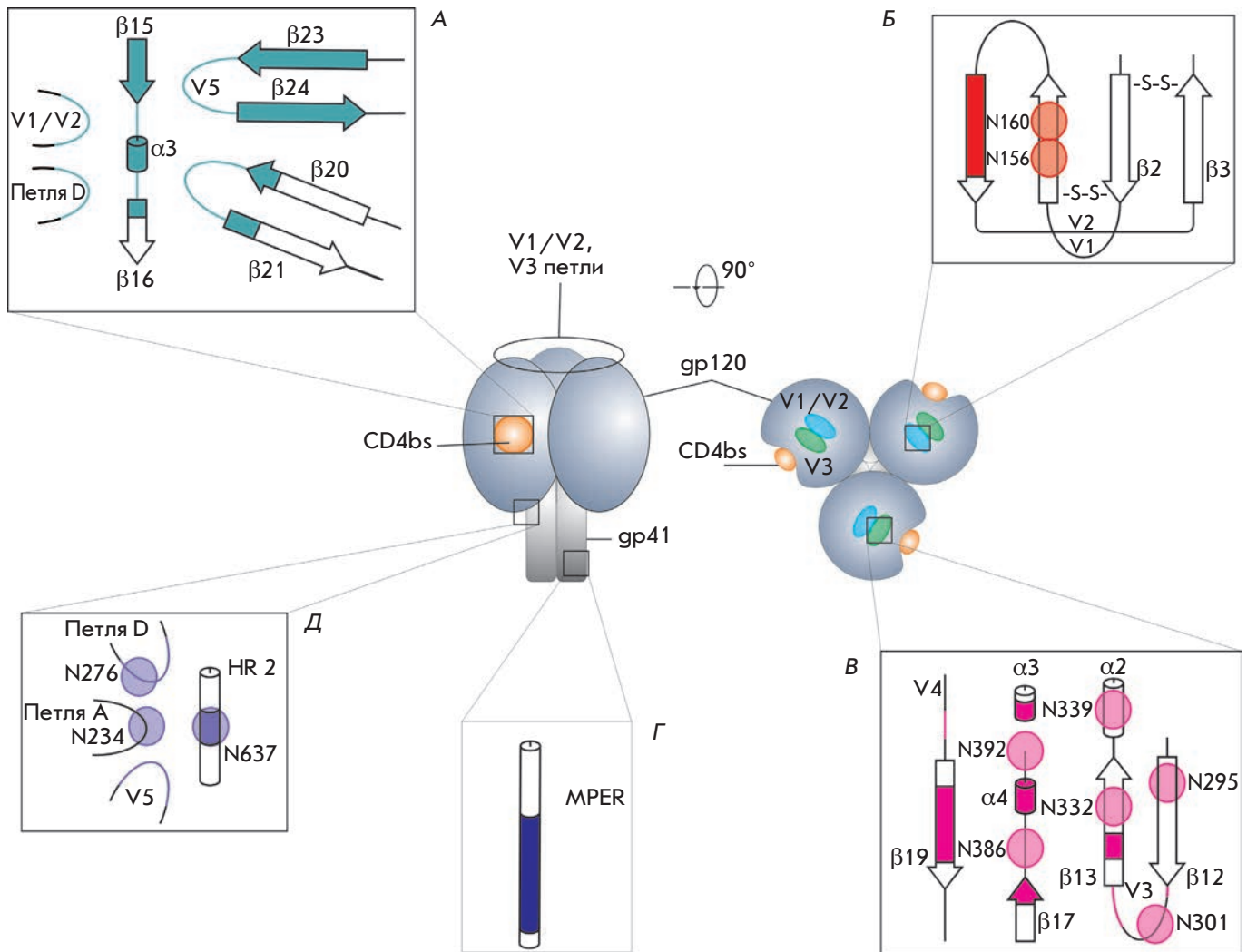


Рис. 2. Схематическое изображение поверхностного тримерного гликопротеинового комплекса ВИЧ-1-Env и регионы его уязвимости, с которыми связываются антитела, нейтрализующие широкий спектр первичных изолятов. α -Спирали обозначены цилиндрами, β -тяжи – стрелками, петли – тонкими линиями, гликозилированные аминокислотные остатки – кругами. Подробная информация об антителах, связывающихся с каждым из регионов, представлена в таблице. **А** – CD4bs, участок gp120, связывающийся с рецептором CD4. Основные структурные элементы, участвующие в связывании с антителами, – петли D и V1/V2, переменная петля V5 и фланкирующие ее β -тяжи 23 и 24, фрагменты β -тяжей 20 и 21, район, включающий β -тяж 15, α -спираль 3 и фрагмент β -тяжа 16. Схема региона построена на основе данных [13]. **Б** – регион, образованный переменными петлями V1/V2. В связывании антител принимает участие участок петли, находящийся в конформации β -складки, а также гликаны, связанные с остатками аспарагина в положении 156 и 160. Схема построена на основе данных [14]. **В** – регион на поверхности gp120. Во взаимодействии с антителами к этому региону могут принимать участие следующие структурные элементы: фрагменты β -тяжей 19, 17, 13, фрагменты переменных петель V3 и V4, α -спирали 4 и 3, а также гликаны в позициях N392, N386, N339, N332, N301, N295. Схема построена на основе данных [15]. **Г** – MPER-регион, линейный район в составе gp41. Во взаимодействии с антителами принимает участие участок области MPER. Схема построена на основе данных [16]. **Д** – регион, включающий фрагменты gp120 и gp41. С антителами взаимодействуют гликозилированный фрагмент gp41 вместе с гликаном в районе аспарагина 637, участки петель V5 и D, а также гликаны в позициях 276 и 234. Схема построена на основе данных [17]

Характеристика широконейтрализующих антител против ВИЧ-1

Регион обло- лочки	Эпитоп (специфичность)	Антитело	Год выде- ления	Ширина нейтрализа- ции, %	Эффектив- ность ней- трализации*, мкг/мл	Длина CDR H3, амино- кислотные остатки	Соматические мутации, % аминокислот- ных замен
gp41 MPER	ELDKWA [18]	2F5**	1992	55-67 [39, 40, 57, 58, 59]	1.44 [40]	24	15.2
	WFD(I/L)(T/S) NW(L/I)WYIK [60]	4E10**	1994	85-100 [36, 39, 57, 58, 61, 62]	1.62 [40]	20	15.6
	SLWNWFDITN [63]	Z13**	2001	35 [62]	40 [62]	19	21
	WNWFDITN [63]	Z13e1**	2007	50 [36]			
	WFDITNWIWYIL/R [57]	10E8	2012	98-99 [40, 57, 58]	0.25 [40]	22	22.1
gp120 CD4bs	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	b12**	1991	35-75 [32, 38, 39, 61]	2.82 [39]	18	17.3
	«Коровый» эпитоп между внутренним и внешним доменом, остатки D474, M475, R476 важны для свя- зывания [64]	HJ16	2010	36 [61]	8.01	21	36.7
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC01	2010	88-93 [38, 40, 44, 45, 51, 57, 58, 65]	0.09 [45] 0.92 [48]	14	38.8
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC02	2010	90-91 [38, 40]	0.13 [40]	14	34.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC03	2010	51-59 [38, 40, 58]	0.08 [44]	16	34.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	PGV04 (VRC- PG04)	2011	77-88 [40, 44, 46, 51]	0.14 [40]	16	38.2
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	CH31 (VRC- CH31)	2011	84-91 [40, 44, 66]	0.02 [44]	15	31.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4- связывающая петля	CH33 (VRC- CH33)	2011	90 [44]	0.24 [44]	15	31.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	NIH45-46	2011	84-86 [40, 45, 48]	0.08 [45] 0.41 [48]	18	44
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	45-46 ^{G54W}	2011	92 [48]	0.04 [48]	18	44
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	3BNC117	2011	86-92 [40, 45, 58]	0.06 [40]	12	36.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	12A12	2011	92-96 [40, 45]	0.07 [40]	15	34
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC23	2013	65-80 [40, 58]	0.58 [40]	Нет данных	Нет данных

Вариабельная петля V1/V2 gp120	Гликаны в позиции N160 и N156 и фрагмент β-складки вариабельной петли V1/V2	PG9	2009	77–83 [39, 40, 51, 57, 58]	0.08 [58]	30	15.4
		PG16	2009	73–79 [39, 40, 57, 58]	0.02 [57]	30	16.8
		PGT145	2011	78 [51]	0.29	33	22.8
		CH01	2011	46 [50]	3.75 [50]	24	23.3
Вариабельная петля V3 gp120	Три гликана в позициях N332, 339, 392	2G12	1994	28–39 [39, 40, 61]	1.45 [40]	16	33.6
		PGT121	2011	70 [51]	0.03	26	21.2
		PGT128	2011	72 [51]	0.02	21	27.9
CD4i/V3 gp120	Петля V3	3BC176	2012	64 [67]	12.8 [67]	19	29.4
Регион на стыке gp120 и gp41	Гликан-зависимый эпитоп (комплекс N-гликанов с галактозой на конце в позиции N611 и N637)	PGT151-155	2014	64–66 [56]	0.008–0.012 [56]	28	Нет данных
		8ANC195	2011	67 [45]	0.87 [45]	9	Нет данных

Примечание. Строки, выделенные серым, содержат информацию о bNAbs первого поколения.

* – % нейтрализации подсчитан, исходя из количества нейтрализованных вирусов при IC₅₀ при концентрации антиген ниже 50 мкг/мл.

** – наличие полиреактивности.

было случайным, поэтому в природе такое антитело может не встречаться [32].

Антитело 2G12 взаимодействует с α1→2 маннозными остатками gp120 в районе вариабельных петель V3 и V4 [33] и имеет уникальное строение. Тяжелые цепи этого антитела перекрещиваются, каждая легкая цепь взаимодействует с константным доменом одной тяжелой цепи и вариабельным доменом другой, в результате чего Fab-фрагменты необычно близко примыкают друг к другу. Подобное анти-ВИЧ-антитело выделено только от одного больного. Эпитоп, узнаваемый 2G12, является конформационным, он сильно зависит от гликозилирования остатков аспарагина в C2-, C3-, C4-доменах и петле V4.

bNAbs 2F5 и 4E10 узнают линейные перекрывающиеся фрагменты в области MPER-региона gp41, при этом оба антитела обладают полиреактивностью [34]. Эти антитела способны одним Fab-фрагментом прочно связываться с MPER-регионом, а вторым взаимодействовать с другими антигенами на поверхности ВИЧ, хотя и менее прочно, что и обуславливает их способность нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов вируса [34].

Антитело Z13, как и IgG1b12, получено с помощью технологии фагового дисплея. Позже с целью повышения аффинности путем внесения аминокислотных

замен в последовательность паратопа был получен его клональный вариант Z13e1. Это позволило получить антитело, обладающее примерно в 35 раз большей силой связывания, чем исходный вариант [19, 35, 36].

Исследования, выполненные на больших панелях псевдовирюсов различных подтипов, показали, что антитела первого поколения обладают, в целом, умеренной шириной и эффективностью нейтрализации. Для достижения эффективной нейтрализации различных изолятов ВИЧ-1 необходимы смеси этих антител в высокой концентрации, что представляет весьма сложную задачу. В то же время на приматах показано, что использование для пассивной иммунизации смеси нейтрализующих антител b12, 4E10, 2F5 и 2G12 защищает обезьян от инфицирования вирусом SHIV89.6P [37]. Данный факт существенно стимулировал дальнейшие работы по поиску новых bNAbs.

bNAbs ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Довольно долгое время попытки получить нейтрализующие антитела с лучшими характеристиками были безрезультатными. Лишь в 2009 году удалось обнаружить bNAbs с более высокой эффективностью и способностью нейтрализовать большее разнообра-

зие первичных изолятов ВИЧ-1. К успеху привело использование комбинации трех стратегий: отбор сывороток хронических больных, содержащих высокоаффинные и кросс-реактивные нейтрализующие антитела; использование новых подходов селекции и скрининга клонов В-клеток; разработка высокопроизводительных методов выделения моноклональных антител человека.

Обнаружение в 2009–2010 году антител VRC01 [38] и PG9/PG16 [39] стало ключевым событием в изучении bNAbs. Эти антитела примечательны тем, что, во-первых, способны нейтрализовать огромное разнообразие первичных изолятов ВИЧ-1, а во-вторых, обладают высокой эффективностью нейтрализации, т.е. концентрации этих антител, обеспечивающие эффективную нейтрализацию вируса, на порядок меньше, чем у антител первого поколения. VRC01, например, способно нейтрализовать до 93%, PG9/PG16 – до 80% первичных изолятов ВИЧ-1, в то время как b12 (bNAbs первого поколения) нейтрализует только 35% [40].

Получение VRC01 стало возможным благодаря специальному подходу, разработанному Дж. Маскола и соавт. [38]. Были сконструированы белки «наживки», представляющие собой рекомбинантные формы стабилизированного gp120 с измененной поверхностью, названные RSC (Resurfaced Stabilized Core). С целью лучшего доступа антител к нужной области в RSC удалены три вариабельные петли, а поверхностные аминокислотные остатки заменены таким образом, чтобы ни одна область gp120, за исключением CD4bs, не распознавалась циркулирующими в организме антителами. Кроме того, для проведения негативной селекции получен вариант ΔRSC, имеющий мутантный участок связывания с CD4. С использованием RSC выявлены сыворотки ВИЧ-положительных пациентов, содержащие антитела к CD4bs. Из их крови выделено более 25 млн В-клеток памяти, которые инкубировали с RSC и ΔRSC, помеченными флуорохромами. Затем при помощи проточного цитофлуориметра-сортера отобрали редко встречающиеся В-лимфоциты, специфичные только к CD4bs. После этого с использованием технологии single-cell RT-PCR [41] получили κДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антител индивидуальных В-лимфоцитов, которые затем клонировали в специальных векторах экспрессии [38].

Антитела PG9 и PG16 были выделены несколько раньше, чем VRC01. Для поиска этих антител, как и VRC01, использовали авторскую методику [39]. На первом этапе проводили сортировку активированных В-клеток ВИЧ-инфицированных. Проверяли способность антител из этих клеток нейтрализовать первичные изоляты ВИЧ-1 (JR-CSF и SF162) и свя-

зывать рекомбинантные аналоги гликопротеинов gp120 и gp41. В результате отобрали клоны В-клеток, с использованием мРНК из которых получили рекомбинантные антитела. На следующем этапе из большого набора антител отобрали пять с лучшими характеристиками нейтрализации панели псевдовирусов. Два из пяти антител, названные PG9 и PG16, обладали способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1.

РЕГИОНЫ УЯЗВИМОСТИ Env И bNAbs ПРОТИВ НИХ

Регион CD4bs

Наибольшее внимание с момента выделения bNAbs второго поколения привлекало антитело VRC01. Это стало следствием того, что VRC01, обладая превосходными характеристиками нейтрализации, взаимодействует с тримером gp120 в одном из наиболее консервативных участков этого комплекса, а именно, в месте связывания молекулы gp120 с рецептором CD4 на поверхности лимфоцитов (CD4bs). Именно CD4bs как центральный регион уязвимости представляется наиболее очевидной и привлекательной мишенью для антител, способных нейтрализовать антигенно гетерогенную популяцию вируса (рис. 2А). Существование подобных антител предполагалось ранее [24, 42]. Однако, кроме «искусственного» антитела b12, долгое время не удавалось обнаружить другие антитела к этому региону. Новая методика выделения антител позволила получить три bNAbs (VRC01, VRC02 и VRC03), связывающихся с CD4bs. Все они оказались соматическими вариантами, близкими по своим характеристикам, при этом VRC03 проявлял намного меньшую широту нейтрализации [38]. Уже первые эксперименты показали, что антитело VRC01 имеет ряд особенностей, в первую очередь, высокий уровень соматических мутаций в гипервариабельных областях. Обычно количество соматических мутаций в антителах составляет 5–20%, у VRC01 этот показатель достигает 40%. Еще одна особенность этого антитела – сходство структуры вариабельного домена антитела и структуры рецептора CD4 Т-хелперных клеток. Взаимодействие вариабельного домена VRC01 частично имитирует взаимодействие рецептора CD4 с CD4bs на поверхности gp120 [13]. При этом взаимодействие антитела стерически более точно, что и позволяет ему достигать впечатляющих результатов в реакции нейтрализации. Несмотря на достаточно близкую имитацию рецептора CD4, взаимодействие VRC01 с gp120 имеет ряд отличий. При взаимодействии молекулы CD4 с поверхностью тримера Env в субъединице gp120 происходят структурные перестройки, в то время как при сходном контакте антитела VRC01 с триме-

ром таких изменений не возникает. Напротив, антитело закрепляет промежуточную конформацию тримера, препятствующую проникновению вируса в клетку [43].

Вслед за выделением VRC01 последовали работы, в которых с использованием аналогичного подхода выделили еще ряд CD4bs-связывающих антител, таких, как PGV04, CH30–34 [44], 3BNC117, 3BNC60, 3BNC55, 12A21, 12A12, 8ANC195, 8ANC131, 8ANC134, NIH45–46, 1NC9, 1B2530 [45].

Несмотря на то что все эти антитела взаимодействуют с регионом CD4bs на поверхности gp120, детали этого взаимодействия могут существенно различаться [45]. Например, некоторые из них при связывании с мономером gp120 способны вызывать конформационные изменения, подобные тем, которые вызывает CD4-рецептор, в то время как другие такой способностью не обладают [46]. Кроме того, антитела, связывающиеся с CD4bs, несмотря на их структурную близость, могут быть продуктами различных генов, что позволяет выделять подклассы среди VRC01-подобных антител [47].

Отдельно необходимо упомянуть антитело NIH45–46^{G54W}. Получение этого антитела стало результатом теоретической работы по улучшению одного из наиболее эффективных антител, связывающихся с CD4bs, – NIH45–46. Анализ модели комплекса NIH45–46 с gp120, полученной на основе рентгенографических данных, дал основание предполагать, что замена глицина в позиции 54 на триптофан повысит площадь контакта между антителом и вирусным гликопротеином. В результате направленного мутагенеза по замещению глицина на триптофан получено антитело NIH45–46^{G54W}, которое действительно обладает повышенной шириной и эффективностью нейтрализации [48].

Регион связывания PG9 и PG16

Антитела PG9 и PG16, представляющие собой соматические варианты, отличаются шириной нейтрализации. Так, PG9 нейтрализует 78% псевдовирусов панели, в то время как PG16 – 73%. Более того, эффективность нейтрализации некоторых псевдовирусов этими антителами различается на 2 порядка. Это может говорить о том, что эпитопы, с которыми взаимодействуют антитела PG9 и PG16, несколько различаются.

Во взаимодействии PG9/PG16 с тримером gp120 важное значение имеют углеводы, связанные с остатками аспарагина в положении 156 и 160. В отличие от полученного ранее антитела 2G12, которое взаимодействует с гликанами аспарагинов N332, N339 и N392 [33], во взаимодействии с PG9 и PG16 вовлечены не только углеводы, но и аминокислот-

ные остатки gp120 в районе второй и третьей вариабельных петель (V2, V3) [39]. Искусственные белки, имитирующие структуру контактирующего с PG9 региона gp120, позволили выяснить детали взаимодействия PG9 с антигеном. Центральная роль в стабилизации комплекса PG9–gp120 принадлежит третьей вариабельной петле тяжелой цепи антитела (CDR H3), которая имеет ряд структурных особенностей. Необычайная длина этой петли – 30 аминокислотных остатков, позволяет ей, проникая мимо связанных с gp120 углеводов, достигать поверхности белка в районе петель V2 и V3 гликопротеина gp120. Вершина петли имеет молотообразное строение, образованное двумя β-складками. Внешняя β-складка CDR H3 антитела образует четыре водородных связи с β-складкой в основании петли V2 (рис. 3). Кроме водородных связей, немаловажную роль в связывании антитела с эпитопом играет взаимодействие отрицательно заряженной CDR H3 с углеводами, связанными с остатками аспарагина в позициях N160 и N156. Площадь контакта между третьей вариабельной петлей и углеводами составляет не менее половины общей площади взаимодействия этого антитела с gp120 [14]. Предполагается, что это взаимодействие частично имитирует природное взаимодействие тримера gp120 с поверхностью клетки [49].

Антитела PG9 и PG16 – первые из идентифицированных bNAbs, которые взаимодействуют со вторым регионом уязвимости Env, включающим аминокислотные остатки петель V1/V2 и олигоманнозные цепочки в позициях 160 и 156 (или 176) (рис. 2B). Позже получили ряд широконейтрализующих антител, таких, как CH01–04 [50] и PGT141–145 [51], которые связываются с этим регионом [14]. Отличительная черта всех этих антител – необычайная длина CDR H3, позволяет им не только эффективно преодолевать углеводный щит gp120, но и взаимодействовать с углеводами, что вносит большой вклад в связывание антитела с вирусным гликопротеином [14].

Регион петли V3

Центральные элементы еще одного региона уязвимости тримера gp120, с которым взаимодействует существенное число широконейтрализующих антител, – гликан аспарагина N332, обогащенный остатками маннозы, и фрагмент третьей вариабельной петли (V3) (рис. 2B) [15]. К группе антител, связывающихся с этим районом, можно отнести антитело первого поколения 2G12, поскольку углеводные остатки на поверхности gp120, образующие эпитоп 2G12, расположены в этом же регионе. Все другие bNAbs, связывающиеся с этим регионом, используют, кроме углеводов, аминокислотные остатки gp120 (таблица). Структурная организация этих антител,

как и PG9-подобных антител, определяется возможной доступностью белкового остова. Антитела PGT127-128 имеют удлиненную петлю CDR H2, а антитело PGT135 – удлиненную CDR H1 [52].

Антитело PGT135 использует две удлиненные петли (CDR H1 и CDR H3) для проникновения сквозь углеводный щит gp120, при этом более существенный вклад вносит CDR H3. Помимо контакта с белковой частью gp120, обе цепи антитела взаимодействуют и с прилегающими гликанами. CDR H3 взаимодействует с гликанами аспарагинов N332, N386 и N392, а CDR H1 – только с гликаном N386. Как и у антитела PG9, площадь контакта PGT135 с углеводной частью эпитопа составляет не менее половины от общей площади контакта и вносит решающий вклад в суммарную энергию связывания антитела с эпитопом [15]. Меньшую роль углеводы играют во взаимодействии антитела с gp120 другого bNAbs, PGT128. Это антитело также взаимодействует с гликаном N332, однако основная роль принадлежит гликану N301, который взаимодействует как с CDR H3, так и с CDR H2. CDR H2 за счет удлиненной структуры вносит заметный вклад во взаимодействие антитела с gp120. Однако более важна небольшая β -складка на вершине CDR H3 и β -складчатый участок петли V3 gp120. Именно этот контакт за счет образования водородных связей наиболее значим для взаимодействия PGT128 с Env [53].

Стоит отметить еще два антитела, связывающихся с этим регионом, – PGT121 и 10-1074, которые, в отличие от 2G12, PGT135 и PGT128, взаимодействуют с гликанами сложного типа, менее представленными на поверхности Env, чем с гликанами олигоманнозного типа [54].

Если расположить антитела 2G12, PGT135 и PGT128 по степени участия углеводов в их взаимодействии с антигеном, то первым в ряду будет 2G12, взаимодействующее только с углеводами. Вторым – PGT135, у которого взаимодействие с углеводами вносит больший вклад, чем взаимодействие с аминокислотным остовом. Последнее в ряду – PGT128, взаимодействие которого в большей степени определяется контактом CDR H3 с аминокислотными остатками петли V3. Интересно, что в этом ряду по мере роста участия белковой части растет ширина нейтрализации (см. *таблицу*). Из этого можно сделать вывод, что ширина нейтрализации зависит от доли, которую во взаимодействии антитела с антигеном занимает белковый контакт. Антитело 2G12, взаимодействующее только с углеводами, хотя и способно нейтрализовать ряд изолятов, тем не менее, обладает умеренной шириной нейтрализации, и напротив, при большой доле участия белка во взаимодействии наблюдается максимальная ширина

нейтрализации. Можно предположить, что использование иммуногенов, индуцирующих наработку антител, которые связываются только с углеводами на поверхности тримера Env, не будет приводить к образованию достаточно эффективных bNAbs.

Регион MPER

Четвертый регион уязвимости – MPER gp41. Этот регион, как и регион CD4bs, долгое время рассматривали как одну из предпочтительных мишеней для широконейтрализующих антител. Как и регион CD4bs, MPER gp41 обладает высокой степенью консервативности. Это связано с тем, что регион MPER – это ключевой элемент в процессе слияния вирусной мембраны и мембраны клетки, и выполнение этой функции требует сохранения постоянства аминокислотного состава. Действительно, bNAbs, связывающиеся с этим регионом, найдены одними из первых. Однако изучение ВИЧ-инфицированных, чьи сыворотки обладали способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1, показало, что связывающиеся с этим регионом bNAbs встречаются редко. Более того, моноклональные антитела 2F5, 4E10, Z13 к этому региону обладают полиреактивностью. В то же время в 2012 году обнаружили антитело 10E8 (*таблица*), связывающееся с этим регионом и способное нейтрализовать чрезвычайно большой спектр первичных изолятов ВИЧ-1 (до 99%), не обладая при этом полиреактивностью.

Регион на границе gp120 и gp41

Совсем недавно были открыты bNAbs, связывающиеся одновременно с gp120 и gp41 [17, 55]. Как и у большинства bNAbs (кроме связывающихся с регионом MPER gp41), во взаимодействии с этими антителами со стороны Env принимают участие углеводы, однако, в отличие от других антител, углеводы, критичные для связывания антител серии PGT151-158 [56] и 8ANC195 [17], располагаются на gp41. Большинство структурных особенностей у этих антител общие с уже известными bNAbs. Так, антитело 8ANC195 имеет удлиненную петлю CDR H3 и выступающий каркасный участок FWR3. Такая структура позволяет антителу успешно проникать мимо гликанов N234 и N276, контактируя с петлями D и V5 gp120 [17]. Антитело PGT151 обладает удлиненными петлями CDR H3 и CDR L1 и способно взаимодействовать с Env в конформации, которую этот комплекс образует перед слиянием вирусной и клеточной мембран. Интересную особенность антител серии PGT151-158 представляет их способность опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность [56].

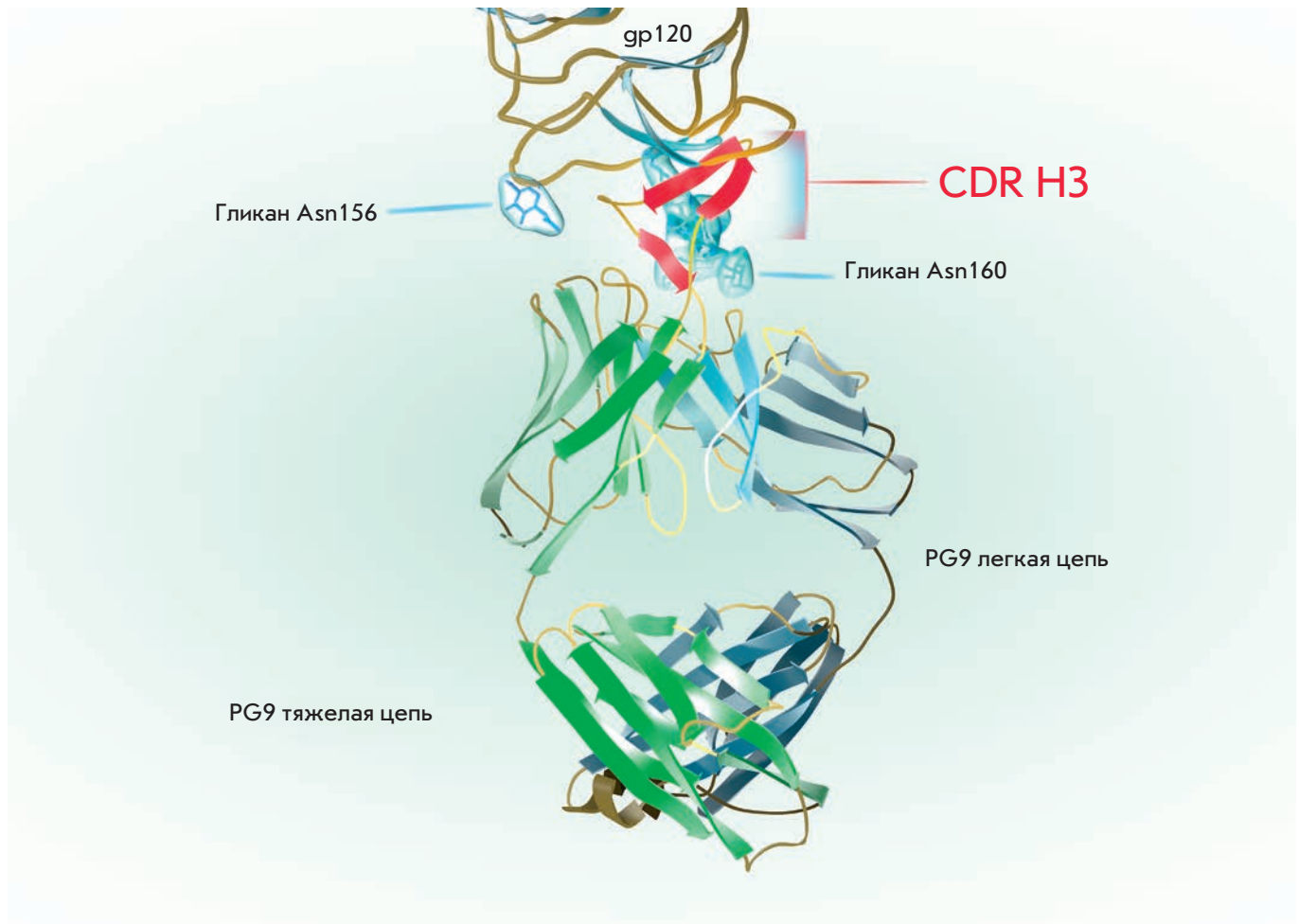


Рис. 3. Комплекс Fab-фрагмента антитела PG9 и вирусного поверхностного белка gp120 ВИЧ-1. Варибельный и константный домены тяжелой цепи окрашены в зеленый цвет, варибельный и константный домены легкой цепи – в серый. Отдельно выделена третья варибельная петля тяжелой цепи антитела CDR H3, имеющая необычную длину и проникающая к аминокислотным остаткам gp120 мимо гликанов. β -Складки петли CDR H3, играющие важную роль во взаимодействии, показаны красным цветом. Гликаны, связанные с остатками аспарагина N160 и N156, мимо которых проникает петля CDR H3 PG9, показаны в виде синих облаков. Изображение сделано на основе структур 3U4E и 3DNN из Protein Data Bank

ВЫВОДЫ

Открытие и изучение широконейтрализующих антител против ВИЧ-1 стало важной вехой в развитии знаний о механизмах гуморального иммунного ответа. Несмотря на то что появление этих антител в организме не позволяет избежать развития СПИДа и полностью элиминировать вирус, на их примере мы видим удивительный спектр адаптивных возможностей В-клеточного иммунитета, позволяющих противодействовать даже таким изощренным вирусам, как ВИЧ-1.

Изучение широконейтрализующих антител показывает, что иммунная система, несмотря на постоянный «уход» ВИЧ-1 от иммунного ответа, обладает

способностью за счет механизмов соматического мутагенеза вести отбор антител, которые могут, в конечном итоге, связываться с небольшим числом «замаскированных» константных участков белков вируса и нейтрализовать его.

Необычно высокая нейтрализующая способность bNAbs связана, в основном, с их структурными особенностями. Прежде всего, обращает на себя внимание строение гиперварибельных петель, участвующих в связывании антигена. За счет аминокислотных вставок петли CDR, особенно CDR H3, удлиняются, что позволяет им преодолевать углеводный щит Env, достигая константного белкового «дна». Более того, форма самих петель изменяется, обеспечивая макси-

мально возможную площадь контакта петли с антигеном.

Важная особенность, очень часто наблюдаемая у широконейтрализующих антител против ВИЧ-1, – вовлечение углеводных остатков gp120–gp41 в связывание с антигеном. В комплексе с небольшими константными участками белка углеводы оказываются прекрасной мишенью для таких антител. Более того, зачастую углеводы вносят равный и даже больший вклад в суммарную энергию связывания антитела с антигеном.

Еще один интересный механизм, которым могут пользоваться bNAbs – это мимикрия. Один из регионов уязвимости Env ВИЧ-1 – регион взаимодействия gp120 с рецептором CD4 Т-клеток. Паратоп антител,

связывающихся с этим регионом, имитирует структуру рецептора CD4 и тем самым обеспечивает высокую надежность и специфичность взаимодействия.

Все эти открытия, с одной стороны, раскрывают огромный потенциал, которым обладает иммунная система для противодействия патогенам, а с другой, позволяют утверждать, что вакцина, способная вызвать наработку широконейтрализующих антител, сможет защитить от этой инфекции. ●

Авторы выражают благодарность за критические замечания А.И. Шаповалу, за подготовку иллюстраций Е.А. Колосовой. Работа выполнена при поддержке РФФИ (соглашение № 14-14-00660).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // Успехи химии. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
3. Peeters M., D'Arc M., Delaporte E. // AIDS Rev. 2014. V. 16. № 1. P. 23–34.
4. Burton D.R., Barbas C.F., Persson M.A., Koenig S., Chanock R.M., Lerner R.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 22. P. 10134–10137.
5. Zhu P., Chertova E., Bess J., Lifson J.D., Arthur L.O., Liu J., Taylor K.A., Roux K.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 26. P. 15812–15817.
6. Pancera M., Zhou T., Druz A., Georgiev I.S., Soto C., Gorman J., Huang J., Acharya P., Chuang G.-Y., Ofek G., et al. // Nature. 2014. V. 514. № 7523. P. 455–461.
7. Nowak S.A., Chou T. // Biophys. J. 2009. V. 96. № 7. P. 2624–2636.
8. Johnson W.E., Desrosiers R.C. // Annu. Rev. Med. 2002. V. 53. № 1. P. 499–518.
9. Gray E.S., Moore P.L., Choge I.A., Decker J.M., Bibollet-Ruche F., Li H., Leseke N., Treurnicht F., Mlisana K., Shaw G.M., et al. // J. Virol. 2007. V. 81. № 12. P. 6187–6196.
10. Frost S.D.W., Wrinn T., Smith D.M., Kosakovsky Pond S.L., Liu Y., Paxinos E., Chappey C., Galovich J., Beauchaine J., Petropoulos C.J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 51. P. 18514–18519.
11. Moore P.L., Gray E.S., Wibmer C.K., Bhiman J.N., Nonyanane M., Sheward D.J., Hermanus T., Bajimaya S., Tumba N.L., Abrahams M.-R., et al. // Nat. Med. 2012. V. 18. № 11. P. 1688–1692.
12. Malenbaum S.E., Yang D., Cavacini L., Posner M., Robinson J., Cheng-Mayer C. // J. Virol. 2000. V. 74. № 23. P. 11008–11016.
13. Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.-Y., Dai K., Finzi A., Kwon Y. Do, Scheid J.F., Shi W., Xu L., et al. // Science. 2010. V. 329. № 5993. P. 811–817.
14. McLellan J.S., Pancera M., Carrico C., Gorman J., Julien J.-P., Khayat R., Louder R., Pejchal R., Sastry M., Dai K., et al. // Nature. 2011. V. 480. № 7377. P. 336–343.
15. Kong L., Lee J.H., Doores K.J., Murin C.D., Julien J.-P., McBride R., Liu Y., Marozsan A., Cupo A., Klasse P.-J., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. № 7. P. 796–803.
16. Guenaga J., Wyatt R.T. // PLoS Pathog. 2012. V. 8. № 7. P. e1002806.
17. Scharf L., Scheid J.F., Lee J.H., West A.P., Chen C., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Mares R., Seaman M.S., Ward A.B., et al. // Cell Rep. 2014. V. 7. № 3. P. 785–795.
18. Muster T., Steindl F., Purtscher M., Trkola A., Klima A., Himmler G., Rucker F., Kattinger H. // J. Virol. 1993. V. 67. № 11. P. 6642–6647.
19. Buchacher A., Predl R., Strutzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Tauer C., Steindl F., Jungbauer A. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1994. V. 10. № 4. P. 359–369.
20. Montefiori D.C., Pantaleo G., Fink L.M., Zhou J.T., Zhou J.Y., Bilska M., Miralles G.D., Fauci A.S. // J. Infect. Dis. 1996. V. 173. № 1. P. 60–67.
21. Dhillion A.K., Donners H., Pantophlet R., Johnson W.E., Decker J.M., Shaw G.M., Lee F.-H., Richman D.D., Doms R.W., Vanham G., et al. // J. Virol. 2007. V. 81. № 12. P. 6548–6562.
22. Gray E.S., Taylor N., Wycuff D., Moore P.L., Tomaras G.D., Wibmer C.K., Puren A., DeCamp A., Gilbert P.B., Wood B., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 17. P. 8925–8937.
23. Simek M.D., Rida W., Priddy F.H., Pung P., Carrow E., Laufer D.S., Lehrman J.K., Boaz M., Tarragona-Fiol T., Miirio G., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 14. P. 7337–7348.
24. Li Y., Svehla K., Louder M.K., Wycuff D., Phogat S., Tang M., Migueles S.A., Wu X., Phogat A., Shaw G.M., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 2. P. 1045–1059.
25. Walker L.M., Simek M.D., Priddy F., Gach J.S., Wagner D., Zwick M.B., Phogat S.K., Poignard P., Burton D.R. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 8. P. e1001028.
26. Thèze J., Chakrabarti L.A., Vingert B., Porichis F., Kaufmann D.E. // Clin. Immunol. 2011. V. 141. № 1. P. 15–30.
27. Cao Y., Qin L., Zhang L., Safrin J., Ho D.D. // N. Engl. J. Med. 1995. V. 332. № 4. P. 201–208.
28. Sather D.N., Armann J., Ching L.K., Mavrantoni A., Sellhorn G., Caldwell Z., Yu X., Wood B., Self S., Kalams S., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 2. P. 757–769.
29. Doria-Rose N.A., Klein R.M., Manion M.M., O'Dell S., Phogat A., Chakrabarti B., Hallahan C.W., Migueles S.A., Wrammert J., Ahmed R., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 1. P. 188–199.
30. Hraber P., Seaman M.S., Bailer R.T., Mascola J.R., Montefiori D.C., Korber B.T. // AIDS. 2014. V. 28. № 2. P. 163–169.
31. Euler Z., van den Kerkhof T.L.G.M., van Gils M.J., Burger

- J.A., Edo-Matas D., Phung P., Wrin T., Schuitemaker H. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 4. P. 2045–2055.
32. Burton D.R., Pyati J., Koduri R., Sharp S.J., Thornton G.B., Parren P.W., Sawyer L.S., Hendry R.M., Dunlop N., Nara P.L. // *Science.* 1994. V. 266. № 5187. P. 1024–1027.
33. Scanlan C.N., Pantophlet R., Wormald M.R., Ollmann Saphire E., Stanfield R., Wilson I.A., Katinger H., Dwek R.A., Rudd P.M., Burton D.R. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 7306–7321.
34. Mouquet H., Scheid J.F., Zoller M.J., Krogsgaard M., Ott R.G., Shukair S., Artyomov M.N., Pietzsch J., Connors M., Pereyra F., et al. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7315. P. 591–595.
35. Zwick M.B., Jensen R., Church S., Wang M., Stiegler G., Kunert R., Katinger H., Burton D.R. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 2. P. 1252–1261.
36. Nelson J.D., Brunel F.M., Jensen R., Crooks E.T., Cardoso R.M.F., Wang M., Hessel A., Wilson I.A., Binley J.M., Dawson P.E., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 8. P. 4033–4043.
37. Ferrantelli F., Rasmussen R.A., Hofmann-Lehmann R., Xu W., McClure H.M., Ruprecht R.M. // *Vaccine.* 2002. V. 20 Suppl 4. P. A61–65.
38. Wu X., Yang Z.-Y., Li Y., Hogerkorp C.-M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L., et al. // *Science.* 2010. V. 329. № 5993. P. 856–861.
39. Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.-Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5950. P. 285–289.
40. Georgiev I.S., Doria-Rose N.A., Zhou T., Kwon Y. Do, Staup R.P., Moquin S., Chuang G.-Y., Louder M.K., Schmidt S.D., Altae-Tran H.R., et al. // *Science.* 2013. V. 340. № 6133. P. 751–756.
41. Tong J., Bendahhou S., Chen H., Agnew W.S. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. № 15. P. 3253–3254.
42. Binley J.M., Lybarger E.A., Crooks E.T., Seaman M.S., Gray E., Davis K.L., Decker J.M., Wycuff D., Harris L., Hawkins N., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 23. P. 11651–11668.
43. Li Y., O'Dell S., Walker L.M., Wu X., Guenaga J., Feng Y., Schmidt S.D., McKee K., Louder M.K., Ledgerwood J.E., et al. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 17. P. 8954–8967.
44. Wu X., Zhou T., Zhu J., Zhang B., Georgiev I., Wang C., Chen X., Longo N.S., Louder M., McKee K., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6049. P. 1593–1602.
45. Scheid J.F., Mouquet H., Ueberheide B., Diskin R., Klein F., Oliveira T.Y.K., Pietzsch J., Fenyo D., Abadir A., Velinzon K., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6049. P. 1633–1637.
46. Falkowska E., Ramos A., Feng Y., Zhou T., Moquin S., Walker L.M., Wu X., Seaman M.S., Wrin T., Kwong P.D., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 8. P. 4394–4403.
47. Kwong P.D., Mascola J.R. // *Immunity.* 2012. V. 37. № 3. P. 412–425.
48. Diskin R., Scheid J.F., Marcovecchio P.M., West A.P., Klein F., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Abadir A., Seaman M.S., Nussenzweig M.C., et al. // *Science.* 2011. V. 334. № 6060. P. 1289–1293.
49. Moulard M., Lortat-Jacob H., Mondor I., Roca G., Wyatt R., Sodroski J., Zhao L., Olson W., Kwong P.D., Sattentau Q.J. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 4. P. 1948–1960.
50. Bonsignori M., Hwang K.-K., Chen X., Tsao C.-Y., Morris L., Gray E., Marshall D.J., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., et al. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 19. P. 9998–10009.
51. Walker L.M., Huber M., Doores K.J., Falkowska E., Pejchal R., Julien J.-P., Wang S.-K., Ramos A., Chan-Hui P.-Y., Moyle M., et al. // *Nature.* 2011. V. 477. № 7365. P. 466–470.
52. Corti D., Lanzavecchia A. // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. V. 31. P. 705–742.
53. Pejchal R., Doores K.J., Walker L.M., Khayat R., Huang P.-S., Wang S.-K., Stanfield R.L., Julien J.-P., Ramos A., Crispin M., et al. // *Science.* 2011. V. 334. № 6059. P. 1097–1103.
54. Mouquet H., Scharf L., Euler Z., Liu Y., Eden C., Scheid J.F., Halper-Stromberg A., Gnanapragasam P.N.P., Spencer D.I.R., Seaman M.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 47. P. E3268–3277.
55. Blattner C., Lee J.H., Sliepen K., Derking R., Falkowska E., de la Peña A.T., Cupo A., Julien J.-P., van Gils M., Lee P.S., et al. // *Immunity.* 2014. V. 40. № 5. P. 669–680.
56. Falkowska E., Le K.M., Ramos A., Doores K.J., Lee J.H., Blattner C., Ramirez A., Derking R., van Gils M.J., Liang C.-H., et al. // *Immunity.* 2014. V. 40. № 5. P. 657–668.
57. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., et al. // *Nature.* 2012. V. 491. № 7424. P. 406–412.
58. Chuang G.-Y., Acharya P., Schmidt S.D., Yang Y., Louder M.K., Zhou T., Kwon Y. Do, Pancera M., Bailer R.T., Doria-Rose N.A., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 18. P. 10047–10058.
59. Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R., Zolla-Pazner S., Katinger H., et al. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 23. P. 13232–13252.
60. Cardoso R.M.F., Brunel F.M., Ferguson S., Zwick M., Burton D.R., Dawson P.E., Wilson I.A. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 365. № 5. P. 1533–1544.
61. Corti D., Langedijk J.P.M., Hinz A., Seaman M.S., Vanzetta F., Fernandez-Rodriguez B.M., Silacci C., Pinna D., Jarrossay D., Balla-Jhagjhoorsingh S., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 1. P. e8805.
62. Zwick M.B., Labrijn A.F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E.O., Binley J.M., Moore J.P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., et al. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 22. P. 10892–10905.
63. Pejchal R., Gach J.S., Brunel F.M., Cardoso R.M., Stanfield R.L., Dawson P.E., Burton D.R., Zwick M.B., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 17. P. 8451–8462.
64. Pietzsch J., Scheid J.F., Mouquet H., Klein F., Seaman M.S., Jankovic M., Corti D., Lanzavecchia A., Nussenzweig M.C. // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207. № 9. P. 1995–2002.
65. Liao H.-X., Lynch R., Zhou T., Gao F., Alam S.M., Boyd S.D., Fire A.Z., Roskin K.M., Schramm C.A., Zhang Z., et al. // *Nature.* 2013. V. 496. № 7446. P. 469–476.
66. Bonsignori M., Montefiori D.C., Wu X., Chen X., Hwang K.-K., Tsao C.-Y., Kozink D.M., Parks R.J., Tomaras G.D., Crump J.A., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 8. P. 4688–4692.
67. Klein F., Gaebler C., Mouquet H., Sather D.N., Lehmann C., Scheid J.F., Kraft Z., Liu Y., Pietzsch J., Hurley A., et al. // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. № 8. P. 1469–1479.

УДК 577.2

Правила выживания: *Escherichia coli* в стационарной фазе

Ф. И. Плетнёв^{1*}, И. А. Остерман¹, А. А. Богданов^{1,2}, О. А. Донцова^{1,2}, П. В. Сергиев¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: philippletnev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2015

РЕФЕРАТ В представленном обзоре рассмотрены основные процессы, характерные для стационарной фазы роста бактериальной культуры, а также регуляторные механизмы, позволяющие бактериям выживать в условиях стресса, вызванного наступлением стационарной фазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА выживаемость, голод, стационарная фаза, стресс, *Escherichia coli*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GASP – фенотип преимущественного роста в стационарной фазе; НТО – нетранслируемая область; TLD – тРНК-подобный домен; MLD – мРНК-подобный домен; тмРНК – транспортно-матричная РНК; ПКГ – программируемая гибель клеток; ТА – токсин-антитоксин; QS – бактериальная система межклеточной коммуникации; VBNC – живые, но некультивируемые бактерии.

ВВЕДЕНИЕ

В природе бактериальная популяция редко находится в благоприятных условиях, сходных с лабораторными условиями культивирования в богатой среде при оптимальной температуре. Влияние неблагоприятных факторов окружающей среды, накопление токсичных отходов метаболизма при голоде, антибиотиков – все это угрожает выживанию *Escherichia coli* и других бактерий. Для защиты от агрессивного влияния окружающей среды бактериальная культура способна переходить в состояние стационарной фазы, в которой происходит активация внутренних систем защиты от стресса. Чтобы выжить в неблагоприятных условиях бактериальная культура способна кардинально изменять свою организацию как на молекулярном уровне, так и на уровне клетки.

Понимание процессов, происходящих в стационарной фазе, необходимо не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. В стационарной фазе клетки становятся на порядки более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов, приобретают способность выживать даже в невероятно агрессивных условиях. Данный обзор посвящен основным процессам, характерным для стационарной фазы.

СТАДИИ РОСТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Рост бактериальной культуры представляет собой процесс последовательного деления клеток, состав-

ляющих эту культуру, с образованием двух идентичных дочерних клеток.

Изучение выживаемости клеток *E. coli* при культивировании в течение нескольких дней выявило характерную форму кривой роста, которую можно разделить на пять фаз. Несмотря на различия в условиях культивирования, измерения и даже видовых особенностей, общая форма этой кривой, за исключением некоторых параметров, всегда остается неизменной (рис. 1) [1].

В момент, когда клетки попадают в питательную среду после пребывания в стационарной фазе, можно наблюдать то, что принято называть лаг-фазой. Особенность этой фазы состоит в практическом отсутствии роста бактериальной культуры в течение некоторого времени, что можно объяснить необходимостью в адаптации клеточного метаболизма к новым условиям окружающей среды. Длительность этой фазы определяется не только видом бактерии, но и тем, насколько долго культура находилась в условиях голода [2].

После адаптации метаболизма к новым условиям культивирования клетки начинают активное деление и входят в так называемую логарифмическую фазу роста. Так как бактериальные клетки размножаются бинарным делением, увеличение количества клеток в среде за единицу времени хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией. Характеристикой роста культуры в логарифмической фазе является

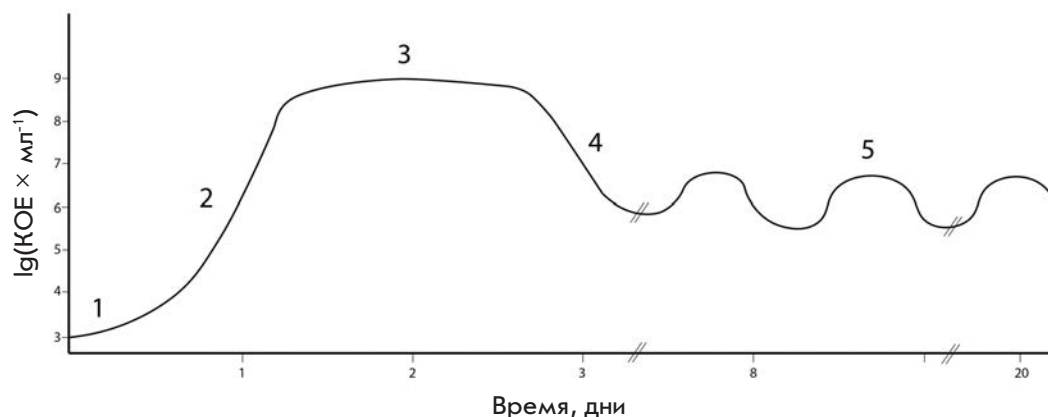


Рис. 1. Кривая роста бактериальной культуры. Отмечены фазы роста 1 – лаг-фаза, 2 – логарифмическая фаза, 3 – стационарная фаза, 4 – фаза смерти, 5 – долговременная стационарная фаза

ся время удвоения количества клеток. Стоит отметить, что этот параметр напрямую зависит от среды культивации и сильно увеличивается при переходе от богатой среды к более бедной. Для стандартного лабораторного штамма *E. coli* MG1655 K-12 время удвоения при 37°C составляет около 30 мин.

После исчерпания питательных веществ в окружающей среде бактериальная культура переходит в стационарную фазу, которая характеризуется равновесием между количеством делящихся и гибнущих клеток и выглядит как плато на кривой роста. Стоит отметить, что термин стационарная фаза относится именно к участку на кривой роста, который характеризуется равновесием между делящимися и гибнущими клетками, а не к механизму защиты при голоде. Стационарная фаза наступает в популяции клеток не только из-за обеднения внешней среды, но и из-за различных стрессов. Со временем в окружающей среде культуры, находящейся в стационарной фазе, начинают накапливаться токсичные продукты катаболизма, что приводит к уменьшению количества клеток. Этот этап роста бактериальной культуры принято называть фазой смерти. В основе этого процесса могут лежать процессы программируемой и случайной гибели клеток.

Конец фазы смерти наступает после того, как большая часть популяции клеток погибает, и остатки питательных веществ из мертвых клеток попадают в окружающую среду. Уцелевшие клетки могут использовать эти вещества для своего выживания, что приводит бактериальную культуру в состояние долговременной стационарной фазы, которая может поддерживаться в течение нескольких недель и даже месяцев. Одна из характерных особенностей долговременной стационарной фазы – циклическое увеличение и снижение титра жизнеспособных клеток в популяции. Этот феномен, названный GASP-фенотипом (Growth Advantage in Stationary Phase), объясняется появлением мутантных клеток, более

приспособленных к росту в данных условиях, чем родительский штамм [3].

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ И ТОПОЛОГИИ ДНК

Геномная ДНК *E. coli* представлена одной кольцевой хромосомой, которая образует в цитоплазме бактерии структуру, называемую нуклеоидом. В состав нуклеоида входят также белки (регуляторные и структурные) и РНК [4].

За поддержание структуры нуклеоида отвечает множество белков, экспрессия которых зависит от фазы роста бактериальной культуры. Наиболее значимыми структурными белками нуклеоида считаются IHF, HU, Dps, Fis и H-NS.

Активная форма H-NS представляет собой димер, для которого характерно наличие двух противоположно направленных ДНК-связывающих доменов, что позволяет белку служить «мостиком» между двумя дуплексами ДНК. H-NS не обладает специфичностью к определенным нуклеотидным последовательностям, но проявляет большее сродство к изогнутой, нежели к линейной ДНК [4]. В логарифмической фазе роста в клетке на 1 молекулу H-NS приходится 1400 п.н. ДНК [5].

Клеточный фактор интеграции (IHF) представляет собой гетеродимерный белок, проявляющий специфичность к консенсусным участкам ДНК длиной примерно 30 п.н. Связывание IHF с ДНК приводит к ее изгибу, который стабилизируется взаимодействием отрицательно заряженного остова ДНК и преимущественно положительно заряженной поверхностью белка. Показано, что связывание IHF может приводить к снижению длины ДНК на 30% [4]. Экспрессия IHF максимальна в стационарной фазе, когда на 1 молекулу белка приходится 335 п.н. геномной ДНК [5]. Вероятно, IHF отвечает за организацию структуры нуклеоида в ранней стационарной фазе.

Гистон-подобный гомодимерный белок HU состоит либо из двух субъединиц HU α , либо из двух

HU β . HU проявляет высокое (40%) структурное сходство с белком IHF. HU неспецифично связывает ДНК, но при этом имеет предпочтение к суперскрученным и неупорядоченным формам ДНК. Похоже, что HU способен вызывать и стабилизировать изгиб двойной спирали ДНК с самыми разнообразными углами поворота. Случайное связывание HU приводит к большому числу «подвижных» изгибов ДНК (с углами изгиба до 180°), что, в конечном счете, способствует уменьшению длины линейной ДНК на 50% [4]. Содержание HU наиболее велико в клетке во время логарифмической фазы, где оно составляет примерно 1 молекулу белка на 550 п.н. ДНК [5].

Фактор стимуляции инверсии (Fis) представляет собой гомодимерный ДНК-связывающий белок, способный распознавать определенные консенсусные последовательности длиной 15 п.н., однако может эффективно связывать ДНК и в случайных участках. Связывание Fis приводит к изгибанию ДНК на 50–90°. Многие сайты связывания Fis находятся в промоторных участках оперонов, связывание белка в которых играет регуляторную роль. Предполагается, что Fis служит «сенсором» суперскрученности ДНК. В зависимости от топологии ДНК Fis проявляет способность к ингибированию экспрессии гена ДНК-гиразы [4]. Fis – один из наиболее представленных в логарифмической фазе структурных белков нуклеоида, содержание которого достигает 1 молекулы на 450 п.н. ДНК [5].

В стационарной фазе нуклеоид становится более конденсированным, что позволяет защищать ДНК от повреждений. Этот механизм реализуется при помощи белка Dps (ДНК-связывающий белок из голодающих клеток), который способен неспецифично связывать ДНК и активен именно в периоды голода [6]. При окислительном стрессе в логарифмической фазе экспрессия гена, кодирующего этот белок, находится под контролем σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы и белка OxyR, в периоды голода – регулируется σ^{38} -субъединицей [7]. После индукции синтеза в стационарной фазе Dps становится наиболее представленным белком в клетках *E. coli* [7]. Мономеры Dps способны образовывать додекамеры в форме колец, которые связываются с ДНК в присутствии ионов магния и способствуют образованию высокоупорядоченного и стабильного нуклеопротеидного комплекса, названного «биокристалл» [8]. Именно образование этого комплекса приводит к конденсации нуклеоида. Похоже, что глобальная защитная роль Dps в отношении различных стрессов (голод, окислительный стресс, УФ-излучение и радиоактивность, тепловой стресс и экстремальные значения pH) осуществляется за счет комбинации нескольких его свойств – способности конденсировать ДНК, хелатировать ионы железа и проявлять ферроксидазную активность, а также за счет способности регулировать экспрессию генов [6, 9].

Еще один белок, способствующий защите ДНК от повреждений в стационарной фазе, – SbpA

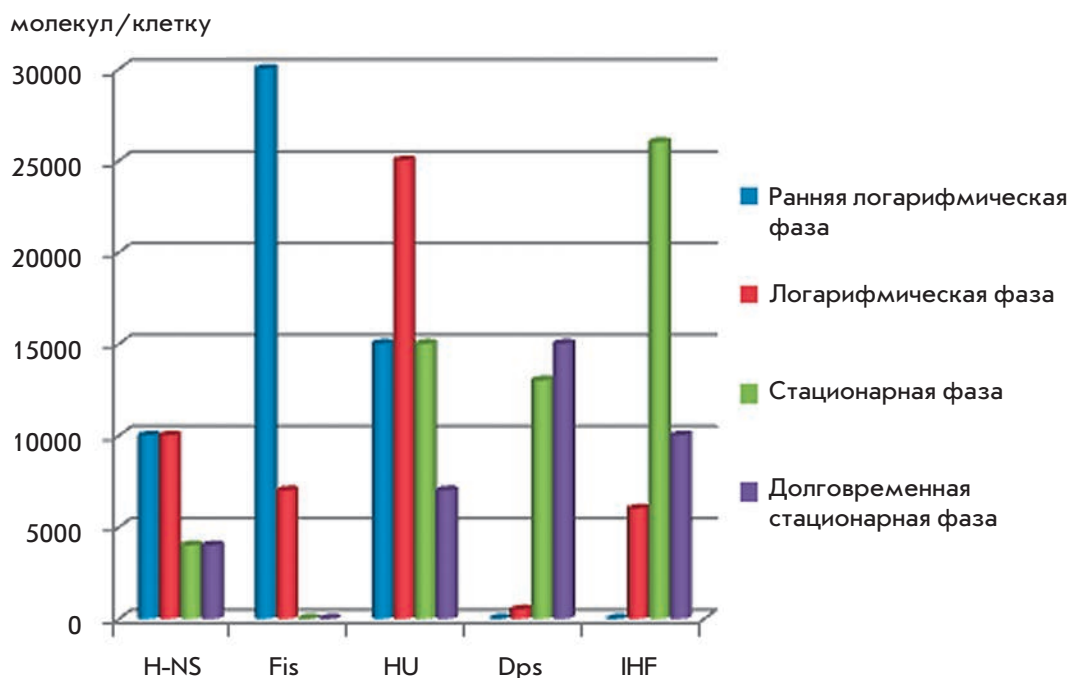


Рис. 2. Нормированные (H-NS, Fis, HU, IHF – димеры, Dps – додекамер) количества структурных белков нуклеоида в зависимости от фазы роста. Построено на основе данных работы [5]

(Curved DNA binding protein). В логарифмической фазе CbpA отсутствует в клетках, однако при наступлении стационарной фазы его количество возрастает до 10000 копий на одну клетку. Транскрипция гена *cbrA* также зависит от σ^{38} -субъединицы РНК-полимеразы [5].

CbpA связывает ДНК в форме димера, что приводит к ее компактизации. В комплексе с этим белком ДНК защищена от деградации эндонуклеазными *in vitro* [10].

Структурные белки нуклеоида прямо влияют не только на структуру бактериальной хромосомы, они активно участвуют в регуляции экспрессии генов. Стоит отметить, что эти белки выполняют сходные функции по компактизации и защите ДНК от повреждений, и преобладание каждого из них в клетке зависит от фазы роста (рис. 2). Однако за счет различий в механизмах и способах компактизации использование того или иного структурного белка нуклеоида позволяет клетке адаптироваться, облегчая доступ к ДНК в благоприятных условиях и максимально защищая генетический материал при стрессе.

Недавно было показано, что метилирование остатков цитозина в бактериальной ДНК может влиять на регуляцию синтеза белков в стационарной фазе. При изучении штамма с нокаутом гена ДНК-метилтрансферазы Dcm установлено, что в нем заметно повышен синтез белков стационарной фазы и, в частности, белка σ^{38} -субъединицы РНК-полимеразы [11].

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ

σ^{38} – сигма-фактор стационарной фазы

Транскрипция – один из центральных и жизненно необходимых процессов, в ходе которого на ДНК-матрице происходит синтез РНК. Эта реакция катализируется РНК-полимеразой.

У бактерий инициацию транскрипции осуществляет холофермент РНК-полимеразы, в состав которого входит кор из субъединиц $\alpha, \beta, \beta', \omega$, содержащий активный центр и выполняющий функцию синтеза РНК, и фактор инициации – σ -субъединица, или σ -фактор. Для образования активного холофермента, способного синтезировать РНК, к РНК-полимеразе должна присоединиться σ -субъединица, которая отвечает за распознавание промотора [12]. Известно, что геном *E. coli* кодирует семь различных σ -факторов (таблица), каждый из которых способен распознавать лишь определенную группу промоторов. Именно σ -субъединица является главным клеточным регулятором транскрипции. Использование различных σ -факторов позволяет клетке кардиналь-

Список σ -факторов *E. coli*

Сигма-фактор	Функция	Источник
RpoD (σ^{70})	Экспрессия генов домашнего хозяйства	[13]
RpoS (σ^{38})	Инициация стационарной фазы и стрессовый ответ	[14]
RpoF (σ^{28})	Синтез флагеллы и хемотаксис	[15]
RpoN (σ^{54})	Активация метаболизма азота	[16]
RpoH (σ^{32})	Ответ на тепловой шок	[17]
RpoE (σ^{24})	Ответ на стресс, связанный с повреждением мембраны	[18]
FecI (σ^{19})	Экспрессия генов транспорта цитрата	[19]

но изменить свой транскриптом в ответ на различные сигналы.

В условиях стационарной фазы бактериальная клетка оказывается перед необходимостью регулировать транскрипцию таким образом, чтобы активировать экспрессию генов, требующихся для выживания в условиях стресса и голода, и подавить транскрипцию «лишних» генов. С этой целью в клетках *E. coli* используется σ^{38} (σ^S)-фактор, кодируемый геном *rpoS*, который выступает в роли главного регулятора транскрипции в ответ на различные стрессы. Полногеномный анализ экспрессии генов, зависимых от σ^{38} -фактора, показал, что σ^{38} прямо или косвенно регулирует транскрипцию примерно 10% генов *E. coli* [20].

σ^S -фактор отвечает за транскрипцию генов, участвующих в стрессовом ответе и вторичном метаболизме. Большая часть генов, регулируемых σ^{38} -субъединицей, подвержена дополнительной регуляции. Именно этот фактор необходим для перехода бактериальной культуры в стационарную фазу. Известны некоторые σ^{38} -зависимые гены, экспрессия которых максимальна в момент перехода культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста [14].

σ^S -фактор является гомологом основного клеточного сигма-фактора – σ^{70} , который отвечает за транскрипцию генов домашнего хозяйства и обладает наибольшим сродством к РНК-полимеразе. Показано, что σ^{38} -субъединица способна узнавать те же консенсусные последовательности, что и σ^{70} , самые значимые из которых – элементы -10 и -35. Предполагается, что различие между промоторами, которые узнаются этими сигма-факторами, состоит в одиночных заменах оснований в районе консенсусных гексамеров, т.е. специфичность σ^{38} может

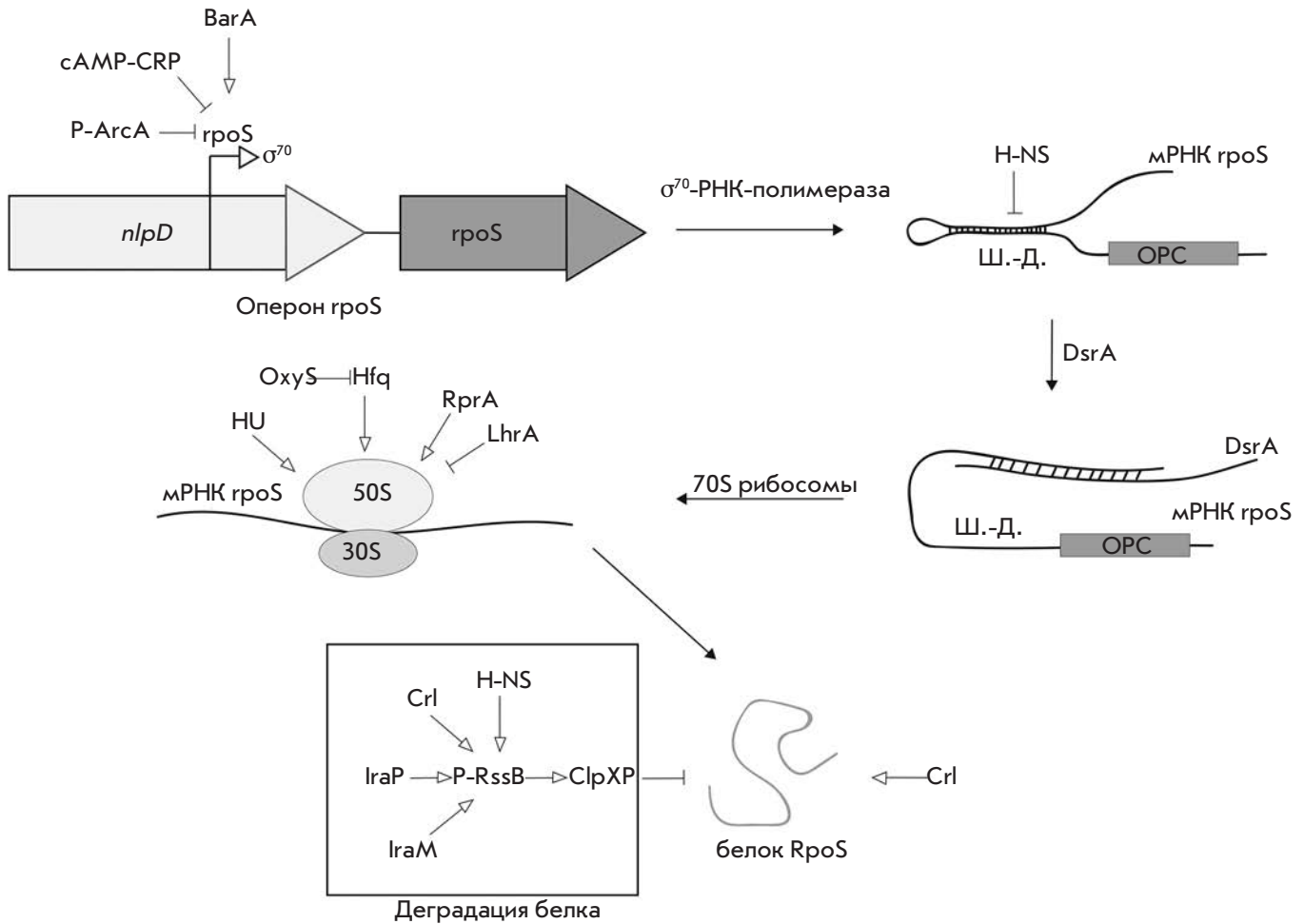


Рис. 3. Схема регуляции экспрессии и активности σ^{38} . В верхней левой части рисунка показана схема регуляции транскрипции гена σ^{38} , *rpoS*. Влияние на транскрипцию белков-регуляторов показано с помощью стрелок. В правой части рисунка иллюстрируется влияние белка H-NS и малой РНК DsrA на вторичную структуру мРНК *rpoS*. В центре показаны белки, влияющие на трансляцию мРНК *rpoS*, а в нижней части рисунка – белки, влияющие на стабильность синтезированного σ^{38} . Последовательность Шайна-Дальгарно обозначена «Ш.-Д.», «ОРС» – открытая рамка считывания

определяться именно незначительным отклонением последовательности гексамера от консенсусной [21]. Сообщается также о предпочтении σ^{38} -РНК-полимеразой промоторов с неоптимальными для σ^{70} последовательностями в области между элементами -10 и -35 [22]. Основываясь на известных последовательностях промоторов, показали, что узнавание промотора σ^{38} -РНК-полимеразой улучшается в присутствии АТ-богатого участка в положениях -10...+1 от точки начала транскрипции [14].

Экспрессия σ^{38} -субъединицы подвержена сложной регуляции на всех уровнях (транскрипции, трансляции, активности фактора, стабильности самого σ^{38} и его мРНК), что, очевидно, позволяет усилить чувствительность ответа клетки на самые разнообразные стрессовые сигналы (рис. 3).

Транскрипция *rpoS* репрессируется фосфорилированной формой регулятора *ArcA* [23], комплекс *cAMP-CRP* также репрессирует транскрипцию [24]. Белок *BarA* необходим для индукции экспрессии в логарифмической фазе роста [25]. Сигнальная молекула *ppGpp* позитивно влияет на базальный уровень синтеза σ^S [26]. При переходе из логарифмической в стационарную фазу экспрессия *rpoS* увеличивается на порядок [24].

Показано, что на вторичную структуру, стабильность и способность мРНК *rpoS* к трансляции влияет множество факторов. мРНК гена *rpoS* содержит длинную 5'-НТО [27], которая играет важную роль в регуляции трансляции и стабильности этой мРНК. Регулятор *H-NS* связывается с мРНК и способствует ее деградации [28]. В свою очередь, малая

РНК DsrA стабилизирует ее и способствует инициации трансляции за счет разворачивания вторичной структуры мРНК в районе сайта посадки рибосомы [29]. Белок Hfq необходим для трансляции мРНК *rpoS* [30], а малая РНК OxyS репрессирует трансляцию σ^S -субъединицы, скорее всего, за счет изменения активности Hfq [31]. Малая РНК RprA и белок HU стимулируют трансляцию σ^{38} -субъединицы. При недостатке фосфора наблюдается аккумуляция σ^S вследствие увеличения количества мРНК *rpoS*. Белок LrhA совместно с Hfq способен репрессировать трансляцию мРНК *rpoS* [32].

Известно, что 6S РНК активирует транскрипцию с некоторых σ^S -зависимых промоторов, никак не влияя на уровень экспрессии *rpoS* [33]. Сигнальная молекула ppGpp усиливает способность σ^S вытеснить σ^{70} из минимального фермента РНК-полимеразы [34]. Показано, что белок Rsd выполняет сходную функцию [35]. Нехватка азота приводит к экспрессии генов, регулируемых σ^S , однако, уровень экспрессии самой субъединицы возрастает при этом лишь в 2 раза, т.е., по-видимому, азотный голод влияет скорее на активность самого сигма-фактора, а не на его экспрессию [36]. Фактор сборки РНК-полимеразы CrI увеличивает активность σ^S , влияя на его способность к связыванию с РНК-полимеразой [37].

В логарифмической фазе роста действует система деградации σ^S -субъединицы, основанная на энергезависимой протеазе ClpXP, которая моментально расщепляет фактор σ^S при избытке энергии в клетке [38]. В качестве фактора-помощника ClpXP выступает белок RssB, необходимый для быстрого протеолиза σ^S . RssB отводится роль узнавания σ^S -фактора. Поли(А)-полимераза, белки IraP, IraM, H-NS и CrI усиливают эффект RssB [37, 39–41]. Транскрипция *rssB* находится под контролем σ^S . Нехватка источников углерода приводит к накоплению сигма-фактора из-за увеличения его стабильности. Молекулярный механизм этого процесса не исследован [42].

Подводя итог, следует отметить, что активная экспрессия *rpoS* наблюдается в ответ на резкие неблагоприятные изменения условий окружающей среды. При этом сложная система регуляции экспрессии этого гена и моментальная деградация σ^S в оптимальных условиях роста позволяют клетке оперативно изменить транскрипционный профиль в ответ на стресс и быстро вернуться к использованию σ^{70} по окончании неблагоприятных условий.

Некоторые регуляторы транскрипции в стационарной фазе

Регуляция транскрипции в стационарной фазе не ограничивается сменой сигма-фактора. Для изменения экспрессии отдельных генов в бактериальной

клетке существует большое количество регуляторов, специфичных для стационарной фазы.

Один из таких регуляторов – высококонсервативный бактериальный белок Lrp (leucine-responsive regulatory protein), который может действовать и как репрессор, и как активатор транскрипции. Этот белок является одним из главных регуляторов стационарной фазы, воздействующим более чем на 400 генов *E. coli*, причем около 75% этих генов активны именно в стационарной фазе роста. Среди них встречаются гены, продукты которых ответственны за биосинтез аминокислот, катаболизм, систему транспорта питательных веществ, синтез пилей, использование различных источников углерода [43]. Основная задача Lrp – адаптация клеточного метаболизма к условиям окружающей среды. Интересно, что Lrp увеличивает уровень анаболизма аминокислот, снижая, вместе с тем, уровень их катаболизма [44].

Экспрессия гена *lrp* позитивно регулируется при помощи сигнальной молекулы ppGpp. Связывание лейцина также может влиять на его активность. Lrp способен активировать экспрессию генов, необходимых во время голода, и репрессировать гены, активные в логарифмической фазе роста. Предполагается, что механизм чувствительности к голоданию основан на связывании молекул лейцина, снижение внутриклеточной концентрации которого может быть признаком этого состояния [45].

Мутации, нарушающие функцию ДНК-связывающего домена Lrp, усиливают эффект GASP-фенотипа, в частности из-за того, что клетки с подобной мутацией способны более эффективно усваивать некоторые аминокислоты [3].

Не только белковые регуляторы, но и малые РНК влияют на экспрессию генов в стационарной фазе. Подобные РНК способны стимулировать трансляцию и влиять на стабильность специфичных мРНК. В геноме *E. coli* обнаружено более 60 генов малых РНК, часть из которых отвечает за регуляцию стрессового ответа. Бактериальные малые РНК представляют собой короткие РНК размером 80–100 нуклеотидов. Для активности многих из них требуется связывание с шапероном Hfq [46], способным образовывать комплекс с AU-богатыми участками РНК, за счет чего он может стабилизировать мРНК или, наоборот, ускорять ее гидролиз и ингибировать трансляцию. Малые РНК DsrA и RprA стимулируют трансляцию σ^S -фактора. В оптимальных условиях роста 5'-НТО мРНК *rpoS* обладает вторичной структурой, блокирующей сайт посадки рибосом. Малые РНК DsrA и RprA способны взаимодействовать с 5'-НТО мРНК *rpoS* за счет комплементарных участков, что приводит к изменению вторичной структуры мРНК и открытию сайта посадки рибосом [47].

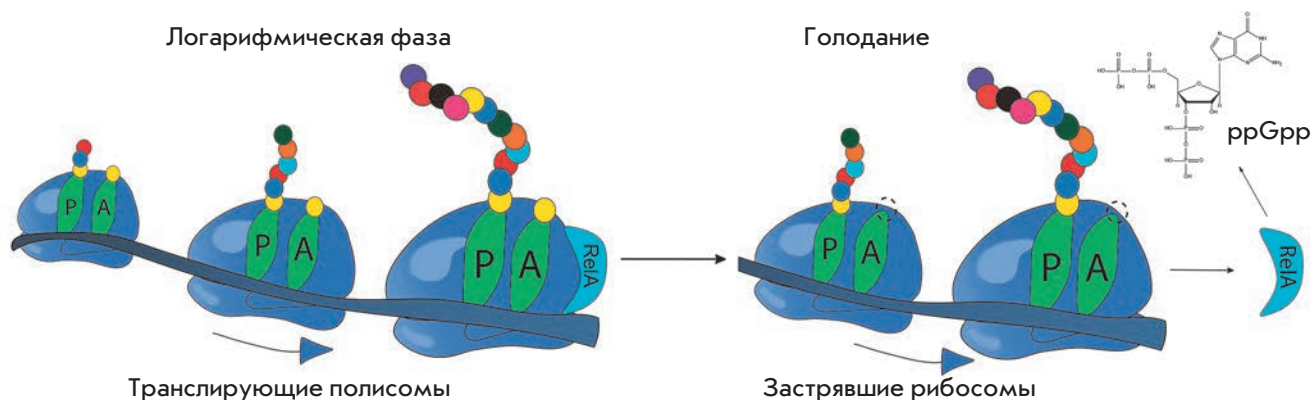


Рис. 4. Схема синтеза ppGpp под действием RelA при аминокислотном голоде

Другая малая РНК, ОхуS, появляется при окислительном стрессе и репрессирует трансляцию RpoS за счет конкурентного связывания РНК-шаперона Hfq [31]. Из других малых РНК, активных в стационарной фазе, можно упомянуть MicA и RybB, которые вовлечены в регуляцию проницаемости внешней мембраны. Именно внешняя мембрана служит первой линией обороны при контакте с окружающей средой. Для защиты клетки от повреждений изменяется состав мембран, что позволяет клетке переживать периоды стресса. Предполагается, что MicA и RybB вместе с Hfq являются компонентами системы антисмыслового ингибирования трансляции. РНК RybB контролирует экспрессию двух белков, компонентов внешней мембраны – OmpC и OmpW. В свою очередь, малая РНК MicA вызывает деградацию мРНК белка внешней мембраны OmpA [48].

СТРОГИЙ ОТВЕТ

Одним из первых механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий, описанных на молекулярном уровне, стало ингибирование синтеза рРНК при аминокислотном голодании. Генетический анализ позволил обнаружить мутацию, приводящую к отсутствию снижения синтеза рРНК в ответ на аминокислотное голодание. Эту мутацию охарактеризовали как «ослабляющую строгость» влияния количества аминокислот на биосинтез РНК [49]. Позже было показано, что эта мутация инактивирует ген *relA*, кодирующий (p)ppGpp-синтазу [50]. В дальнейшем показали, что синтез этого нуклеотидного регулятора является ответом клетки на стресс. Эта регуляторная система контролирует репликацию, трансляцию, транскрипцию и активность ферментов стрессового ответа [51].

Синтез ppGpp осуществляется двумя белками со сходными функциями – RelA и SpoT. RelA, или ppGpp-синтаза I, выполняет лишь функцию синтеза гуанозинтетрафосфата, тогда как SpoT про-

являет двойную каталитическую активность – способность синтезировать ppGpp (ppGpp-синтаза II) и деградировать его (ppGpp-гидролаза). Активность RelA и SpoT регулируется различными механизмами. RelA отвечает за передачу сигнала о нехватке одной или нескольких аминокислот, а SpoT распознает нехватку источников углерода, фосфора, железа или жирных кислот [3].

При обилии питательных веществ RelA находится в ассоциированной с 70S рибосомами форме. В случае аминокислотного голодания в клетке накапливается деацилированная тРНК. Такая тРНК, находясь в избытке, может попасть в А-сайт рибосомы, тогда рибосомы останавливаются, что приводит к диссоциации комплекса RelA с рибосомой. В свободном виде RelA способен катализировать перенос пирофосфата от АТФ к GTP или GDP [52]. Одна из особенностей подобного механизма состоит в том, что RelA реагирует на недостаток одной аминокислоты, даже если другие аминокислоты присутствуют в достаточных количествах [50].

Известно, что одна бактериальная клетка содержит очень мало молекул RelA, что долго не соотносилось с экспериментально наблюдаемой скоростью аккумуляции ppGpp при аминокислотном голоде. Был предложен механизм, согласно которому при появлении «застывших» рибосом, RelA теряет с ними связь. Единичный акт диссоциации сопровождается синтезом одной молекулы ppGpp. После этого свободный RelA способен «перепрыгнуть» на соседнюю рибосому, транслирующую мРНК. Если она также не способна вести синтез из-за деацилированной тРНК в А-сайте, то цикл повторяется, если же она активна, то RelA остается связанным на этой рибосоме в неактивной форме (рис. 4) [52].

В благоприятных условиях роста SpoT обладает лишь гидролитической активностью по отношению к ppGpp, что приводит к отсутствию в клетке гуа-

нозинтетрафосфата. Гидролитическая активность SpoT репрессируется при связывании с деацелированными тРНК. Из-за подобного механизма активации SpoT обладает достаточной активностью лишь при недостатке большого числа различных аминокислот. SpoT, как полагают, ассоциирован с ацилпереносящим белком, что позволяет ему контролировать количество жирных кислот в клетке. Вероятно, этот механизм позволяет ему «чувствовать» и углеродный голод [53]. При понижении концентрации жирных кислот происходит индукция синтеза ppGpp. При помощи белка-партнера DksA ppGpp способен связываться с β -субъединицей РНК-полимеразы, непосредственно влияя на сродство к различным промоторам, чем изменяет уровень экспрессии более 80 генов. Особенно важно подавление экспрессии всех компонентов системы биосинтеза белка: рРНК, рибосомных белков и факторов трансляции [54].

ppGpp вместе с антисигма-фактором Rsd помогает σ^{38} -субъединице конкурировать за ферментативную основу РНК-полимеразы за счет снижения сродства к ней σ^{70} . Когда условия окружающей среды становятся благоприятными, восстанавливается гидролитическая активность SpoT, уровень ppGpp снижается, что означает окончание строгого ответа [34].

ПРОЦЕСС ТРАНСЛЯЦИИ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА *E. coli*

Один из важнейших процессов в клетке – синтез белков, ключевым участником которого является рибосома, сложный нуклеопротеидный комплекс, способный синтезировать белок согласно информации, закодированной в мРНК. В стационарной фазе бактериальной культуры происходит сильное снижение уровня синтеза белка, что не вызывает удивления, поскольку трансляция считается наиболее энергозатратным процессом в клетке, и в условиях нехватки аминокислот и других ресурсов бактериальной клетке нужно подавить трансляцию. Необходимо отметить, что процессы, влияющие на трансляцию в стационарной фазе, сильно зависят от длительности и глубины состояния голода. В ответ на голод активируются самые разные механизмы спасения отдельной клетки, а позже и всей бактериальной популяции.

Механизмы защиты при незначительном голоде

При исчерпании питательных веществ в клетке накапливаются деацелированные тРНК и укороченные мРНК. На подобных мРНК рибосомы могут «застревать», поскольку в процессе синтеза рибосома доходит до конца мРНК и не находит стоп-кодона. Такая рибосома остается связанной с мРНК и не может освободиться из-за того, что механизм терми-

нации трансляции зависит от наличия стоп-кодона. Подобные рибосомы могут быть «спасены» при помощи механизма транс-трансляции.

Транс-трансляция осуществляется комплексом необычной тмРНК (транспортно-матричной РНК) с небольшим белком SmpV. тмРНК состоит из двух доменов: тРНК-подобного домена (TLD) и мРНК-подобного домена (MLD). Сходство TLD-домена и тРНК не только структурное, но и функциональное. Этот домен узнается аланин-тРНК-синтетазой, и 3'-конец тмРНК «заряжается» остатком аланина [55].

В случае появления «застрявших» рибосом совместная работа тмРНК, SmpV и фактора элонгации EF-Tu позволяет распознать их [56], после чего комплекс SmpV и тмРНК попадает в А-сайт рибосомы, где SmpV принимает форму, мимикрирующую под структуру антикодона аланиновой тРНК. Затем за счет гидролиза молекулы GTP происходит перенос пептида с тРНК в Р-сайте на остаток аланина тмРНК в А-сайте, и трансляция возобновляется на матрице MLD-домена тмРНК [56]. В MLD закодирован С-концевой пептид, сигнализирующий о необходимости деградации данной полипептидной цепи. В результате транс-трансляции освобождается «застрявшая» рибосома, и потенциально вредный полипептид деградирует под действием протеаз [57].

Другой путь спасения рибосом, дошедших до 3'-конца мРНК и не встретивших стоп-кодон, – использование белков ArfA и ArfB. Ген *arfA* кодирует короткий полипептид, состоящий из 72 аминокислотных остатков. Функциональная форма этого белка состоит из 55 аминокислот и транслируется с укороченного рибонуклеазой III фрагмента мРНК. Из-за отсутствия стоп-кодона появление такого полипептида возможно лишь в случае нарушения механизма транс-трансляции. ArfA способен связываться с «застрявшей» рибосомой и рекрутировать к ней фактор терминации RF2, что приводит к отщеплению полипептидной цепи с пептидил-тРНК и высвобождению рибосом [58]. Сходным образом действует и фактор ArfB, который способен связываться с пустым А-сайтом рибосом и катализировать гидролиз пептидил-тРНК независимо от факторов терминации трансляции [59].

Гибернация рибосом как ответ на усиливающийся голод

Синтез рибосом относится к чрезвычайно энергетически и ресурсозатратным процессам. Именно поэтому должны существовать механизмы, позволяющие подавить трансляцию, непосильную для голодающих клеток, но сохранить при этом имеющиеся рибосомы до лучших времен.

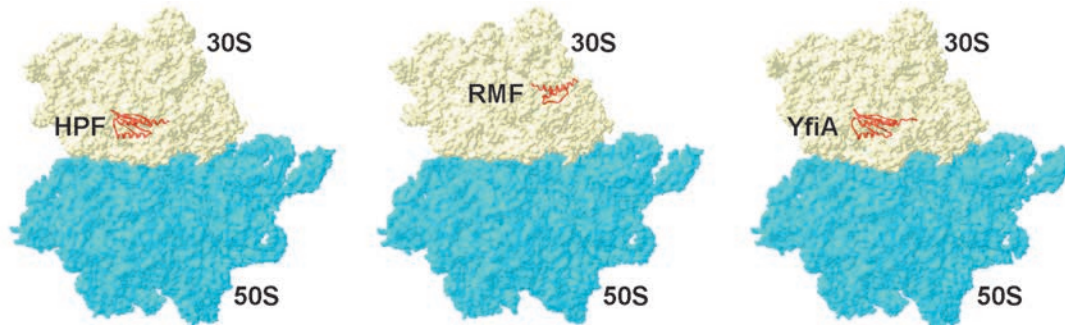


Рис. 5. Сайты связывания гибернационных факторов RMF (PDB: 4V8G), HPF (PDB: 4V8H) и YfiA (PDB: 4V8I)

Оказалось, что механизм хранения неактивных рибосом действительно существует и представляет собой временное «выключение» рибосом. Этот процесс, названный гибернацией рибосом, реализуется в рамках строгого ответа, когда при нехватке аминокислот в клетке накапливаются деацелированные тРНК, что служит сигналом к синтезу молекулы ppGpp при помощи ассоциированного с рибосомами фермента RelA [52]. Именно ppGpp регулирует экспрессию генов, кодирующих белки гибернации рибосомы.

Основной путь гибернации состоит в образовании из активных 70S рибосом «спящих» 100S димеров и неактивных 70S мономеров, а к основным гибернационным белкам *E. coli* относятся HPF, RMF и YfiA (рис. 5).

Первые два белка отвечают за образование неактивных 100S димеров. На первой стадии белок RMF связывается с областью 16S рРНК, которая взаимодействует с последовательностью Шайна-Дальгарно мРНК. Именно этот участок критически важен для инициации трансляции в клетках прокариот, и само связывание этого белка ингибирует трансляцию. Особенно важно то, что RMF не может связываться с транслирующими рибосомами, что предотвращает образование недосинтезированных белков, которые могут быть токсичными для клетки. Связывание гибернационного фактора в этом районе приводит к повороту головы малой субчастицы. Подобное изменение конформации способствует образованию рибосомных димеров 90S. После димеризации двух рибосом и образования 90S димера происходит связывание гибернационного фактора HPF, который дополнительно стабилизирует данную структуру и закрывает доступ тРНК в А- и Р-сайты рибосом. Образовавшийся комплекс двух 70S рибосом вместе с белками HPF и RMF имеет коэффициент седиментации 100S. Димеризация рибосом обратима. Когда клетка попадает в богатую питательными веществами среду, комплекс факторов гибернации и рибосом диссоциирует с образованием двух активных 70S рибосом [55, 60].

Другой путь гибернации рибосом – связывание 70S рибосомами белка Y (YfiA), что приводит к образованию неактивных мономеров 70S. N-Концевая часть белка Y сходна с белком HPF, она также связывается в районе сайта посадки тРНК. При этом С-конец белка препятствует посадке белка RMF в районе последовательности анти-Шайна-Дальгарно на 16S рРНК. Связавшись с рибосомой, YfiA ингибирует ее активность и препятствует диссоциации на отдельные субчастицы. Когда клетка попадает в благоприятные условия, белок Y покидает рибосому, и трансляция возобновляется [60].

Литературные данные свидетельствуют о комплексном влиянии строгого ответа на биосинтез белка в бактериальной клетке. Под действием ppGpp не только подавляется экспрессия аппарата биосинтеза, но через гибернационные факторы ингибируется сама трансляция.

Трансляция в условиях длительного голодания. Фаза смерти и запрограммированная клеточная гибель

Когда в окружающей среде практически полностью исчезают питательные вещества и накапливаются критические количества токсичных отходов метаболизма, активируется система программируемой клеточной гибели (ПКГ), цель которой состоит в уничтожении большей части популяции при сохранении небольшого количества живых клеток. Таким «самопожертвованием» популяция снижает нагрузку на оставшиеся бактерии, которые при появлении новых ресурсов смогут продолжить свой род.

Именно система трансляции особенно чувствительна к усиливающемуся голоданию. Как уже сказано, при помощи компонентов аппарата трансляции, в частности, рибосом, сигнал о голоде передается всем компонентам бактериальной клетки [55]. Механизм ПКГ основан на системе токсин-анти-токсин (ТА), суть которого заключается в наличии двух генов, кодирующих белок, токсичный для клетки, и белок, позволяющий нейтрализовать действие токсина. Деградация антитоксина и выключение его

экспрессии приводят к накоплению активной формы токсина и гибели клетки.

Наиболее изученный и важный модуль ТА – система *mazEF*, выявленная у множества прокариот. Этот модуль состоит из двух генов, находящихся в одном опероне – *mazF* и *mazE*. Первый ген кодирует стабильный цитотоксический белок, а второй – лабильный белок-антитоксин, легко разрушаемый АТР-зависимой протеазой ClpAP. В нормальных условиях экспрессируются гены обоих белков, что не позволяет токсину влиять на клетку из-за образования комплекса токсин-антитоксин. В условиях голода активируется синтез ppGpp, который ингибирует транскрипцию оперона *mazEF*. После этого происходит быстрая деградация *mazE* и высвобождение *mazF*. Токсичность *mazF* обуславливается его эндорибонуклеазной активностью, специфичной к последовательности АСА в мРНК, а также 3'-концевой части 16S рРНК [61]. Отщепление 3'-конца 16S рРНК приводит к «потере» рибосомами последовательности анти-Шайна-Дальгарно, необходимой для трансляции канонических мРНК. Ранее было показано, что подобные рибосомы проявляют высокую селективность к синтезу малых белков, среди которых оказались как белки «смерти», убивающие клетку, так и белки, необходимые для сохранения малой популяции клеток. Предполагается, что таким образом система *mazEF* осуществляет программируемую клеточную гибель, статистически уничтожая большую часть клеток в культуре, сохраняя при этом нетронутой малую популяцию [62].

Позже показали, что эта система ПКГ регулируется при помощи сигнального пептида, названного EDF (Extracellular Death Factor) и имеющего последовательность NNWNN. Этот пептид входит в систему межклеточной связи в культуре, названной Quorum Sensing (QS). При критической плотности популяции в бактериальной культуре появляется пептид EDF, способный легко проникать в клетки. Этот пептид значительно повышает активность *mazE*, снижая при этом способность *mazF* ингибировать токсин. Таким образом, во всех клетках, в которые попал EDF, активируется путь программируемой клеточной гибели, и лишь малая популяция клеток остается нетронутой и способной к дальнейшему выживанию [63].

Структурные особенности клеток в стационарной фазе роста

Переход в стационарную фазу роста, как сказано выше, сопровождается накоплением фактора σ^{38} . Переход к σ^{38} влияет не только на метаболические и регуляторные пути, но и кардинально изменяет физиологию бактериальной клетки. Показано, что гены,

экспрессия которых контролируется σ^{38} , участвуют в изменении морфологии клетки, стрессовом ответе, адаптации метаболизма к голоданию и выживаемости в долговременной стационарной фазе.

Бактерии в стационарной фазе подвергаются критически важной для выживания адаптации морфологии. Клетки становятся меньше, как следствие двух процессов, редукционного деления и образования карликовых клеток [64].

Редукционное деление вызывается тем, что процессы репликации ДНК и деления клеток инициируются в момент перехода клеток в стационарную фазу, когда из-за нехватки ресурсов дальнейший рост клетки заблокирован на всех уровнях регуляции. В стационарной фазе клетки не могут делиться, и из-за возможной случайной инициации репликации ДНК появляются клетки с удвоенным количеством хромосом. В результате, бактериальная культура в стационарной фазе становится чрезвычайно гетерогенной по своему хромосомному составу. Бактериальные клетки могут содержать даже больше двух хромосом [65]. Причиной гетерогенности клеток по содержанию хромосом может быть то, что в некоторых клетках в ходе роста не было достигнуто необходимое расстояние между нуклеоидами, что не позволило произвести деление клетки. Другой причиной может быть то, что в стационарной фазе роста в клетках нарушены процессы терминации репликации или декатенации ДНК [65]. При рассмотрении выживаемости клеток, частоты мутаций и стабильности генома необходимо учитывать, что клетки в стационарной фазе содержат различное число хромосом. Клетки, образованные в результате редукционного деления, имеют форму кокков. Эта морфологическая особенность может объясняться влиянием гена *bolA*, который активно экспрессируется в стационарной фазе под контролем RpoS.

Наиболее вероятно, что влияние *BolA* на морфологию клеток обусловлено регуляцией транскрипции генов *dacA* (ген, кодирующий пенициллинсвязывающий белок 5, РВР5), *dacC* (ген, кодирующий пенициллинсвязывающий белок 6, РВР6) и *atpC* (ген, кодирующий β -лактамазу). Эти белки обладают *D,D*-карбоксипептидазной активностью и участвуют в процессе образования предшественников пептидогликанового слоя мембраны, влияя на степень сшивания пептидогликанов клеточной оболочки за счет регуляции количества доступных для сшивок компонентов [66]. Редукционное деление – это форма адаптации клеток к агрессивным внешним условиям. Редукционное деление позволяет клеткам получать преимущества в условиях голодания из-за увеличения соотношения поверхности к объему клетки. Стоит отметить, что редукционное деление не инду-

цируется голоданием, а обусловлено наступлением голода в момент активного деления клеток.

Образование карликовых клеток, в отличие от редукционного деления, активируется голоданием. Этот процесс характеризуется постоянным уменьшением размера клеток вследствие деградации не только эндогенных ресурсов, но и клеточной оболочки, особенно цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. У некоторых грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, в стационарной фазе наружная мембрана не деградирует и не сжимается, подобно внутренней, что приводит к увеличению области периплазмы [67].

Отличительная особенность адаптации к стационарной фазе – образование клеточной оболочки, способной эффективно противостоять агрессивной внешней среде. Образование подобного усиленного барьера включает в себя обширные изменения на всех уровнях структуры бактериальной оболочки: внутренней и внешней мембран, периплазмы и пептидогликанов. Во внешней мембране увеличивается концентрация липосахаридов, снижается количество белков, а также увеличивается количество молекулярных сшивок между липопотеидами внешней мембраны и слоем пептидогликанов. В периплазме накапливаются олигосахариды, например трегалоза, которые выполняют функцию осмопротекторов. Слой пептидогликанов (пептидогликаны – класс прочных и эластичных полимеров, которые служат неким «амортизатором» стрессового воздействия на клеточную оболочку) ушивается. Недавно было показано, что в стационарной фазе происходит синтез *D*-аминокислот, способных модифицировать слой пептидогликанов за счет включения в состав полимера. В структуре внутренней мембраны происходит ряд значительных изменений. Снижается количество мононенасыщенных жирных кислот с сопутствующим увеличением доли полиненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты также превращаются в циклопропильные производные, увеличивается отношение количества фосфоглицерина к количеству фосфоэтаноламина при переходе клетки к стационарной фазе роста. Следствием всех этих изменений является образование жесткой структуры внутренней мембраны и уменьшение ее текучести [64].

Микроэволюция бактерий в стационарной фазе

Бактериальная популяция может адаптироваться к неблагоприятным условиям самыми неожиданными способами. Во время наблюдения за выживаемостью клеток в стационарной фазе обнаружили, что при достаточно длительной инкубации культуры без смены питательной среды на кривой роста появляется ха-

рактерное циклическое увеличение и уменьшение количества жизнеспособных клеток. Этот феномен был назван GASP-фенотипом, что можно перевести как «фенотип преимущества роста в стационарной фазе». Подобное поведение культуры объясняется появлением в популяции мутантных клеток, более приспособленных к таким условиям, нежели родительский штамм [1].

GASP-фенотип опосредуется несколькими ключевыми мутациями, которые получают преимущество в стационарной фазе. Одна из таких мутаций приводит к снижению активности σ^{38} , при этом штамм с делецией гена *rpoS* не имеет характерного фенотипа. Предполагается, что преимущества, которые дает эта мутация, обусловлены ее плеiotропными эффектами. Возможно, этот эффект обусловлен нарушением равновесия в конкуренции сигма-факторов за РНК-полимеразу [3].

Другая мутация, а точнее группа мутаций, приводящих к GASP-фенотипу, – мутации в генах *lrp* и *sgaC*, а также геномная перестройка, инактивирующая ген *cstA* и активирующая оперон *ybeJ-gltJKL*. Подобные мутанты проявляют повышенную способность использовать аминокислоты, поступающие в окружающую среду из погибших клеток. Геномная перестройка приводит к деактивации гена, кодирующего пермеазу олигопептидов, и активации оперона, кодирующего аннотированные белки-транспортеры глутаминовой и аспарагиновой кислот. Таким образом, за счет потери способности деградировать олигопептиды клетка получает повышенную способность использовать мономерные аминокислоты, поступающие в среду из мертвых клеток. После дополнительной инкубации в клетках с мутацией в гене *rpoS* активируется оперон *bgl*, что приводит к появлению популяции, способной использовать в качестве ресурса арил- β -гликозиды салицин и арбутин [3].

Интересно, что в стационарной фазе появляется популяция клеток, способных к выживанию, но не поддающихся культивированию в лабораторных условиях (VBNC-фенотип). Этот фенотип проявляется как ответ на самые разнообразные стрессы и встречается у многих бактерий. Молекулярная природа механизма VBNC-фенотипа не установлена, однако ясно, что за ним стоит не одиночный регуляторный путь, а глобальная смена метаболизма клетки. Особенностью VBNC-фенотипа являются колоссальное снижение метаболизма и изменение морфологии клеток. Вероятно, таким образом клетка пытается пережить стресс, перейдя в состояния «гибернации» и отгородившись от неблагоприятной среды непроницаемым барьером. Мало известно и о механизме выхода из этого состояния [68].

Устойчивость к антибиотикам в стационарной фазе

Вслед за стремительным ростом частоты использования антибиотиков при бактериальных инфекциях столь же стремительно появляются штаммы бактерий, устойчивых к антибиотикам. Поэтому одной из важнейших проблем современной медицины стала «гонка вооружений» с бактериями. Необходимо находить все больше новых антибиотиков, способных на время преодолеть проблему резистентности. Одно из направлений этой «гонки» предполагает изучение клеточных механизмов, приводящих к резистентности, вместо поиска новых антибиотиков, поскольку ингибируя эти механизмы, можно преодолеть проблему устойчивости бактерий к антибиотикам.

Давно замечено, что устойчивость бактериальной популяции к воздействию различных классов антибиотиков значительно увеличивается при голодании. В стационарной фазе, как уже сказано, происходит ингибирование клеточного цикла и всех этапов реализации генетической информации. Исходя из этого, основным объяснением антибиотикорезистентности стало отсутствие роста бактерий в условиях голодания [69].

Относительно недавно установили молекулярный механизм резистентности бактерий к различным классам антибиотиков именно в стационарной фазе роста, когда происходит задержка клеточного цикла. Показано, что при деактивации генов *relA* и *spoT* (что приводит к невозможности формирования строгого ответа) значительно снижается резистентность бактерий к воздействию антибиотиков и увеличивается внутриклеточная концентрация гидроксильных радикалов. Поскольку известно, что летальное действие практически всех классов антибактериальных препаратов обусловлено, в конечном итоге, накоплением в клетке активных форм кислорода [70], авторы данного исследования решили проверить уровень каталазной активности в клетках, которая оказалась заметно снижена. Таким образом, показано, что не отсутствие роста, а именно активный клеточ-

ный ответ на стресс важен для возникновения устойчивости к антибиотикам в стационарной фазе [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетка подходит к решению вопроса выживания в неблагоприятных условиях с самых разных сторон. Для защиты от механических повреждений и воздействия факторов стресса укрепляется и перестраивается клеточная оболочка, изменяется сама форма клеток. В свою очередь, нуклеоид подвергается конденсации и включается в состав нуклеопротеидного комплекса, защищающего его от повреждений.

Для экономии ресурсов происходит ингибирование процесса трансляции, в частности, через выключение экспрессии генов, кодирующих компоненты аппарата биосинтеза белка. Особенно интересно разнообразие регуляторных путей, через которое происходит ингибирование трансляции. Именно трансляционный аппарат, как наиболее энергозатратный процесс, является ключевым участником передачи сигнала о стрессе другим компонентам клетки. В зависимости от степени голода клетка проходит путь от снижения экспрессии рибосомных оперонов до полного подавления трансляции и деградации рибосом.

Важна также способность клетки использовать альтернативный сигма-фактор для регуляции экспрессии генов стрессового ответа. Сложная система регуляции синтеза и стабильности сигма-фактора позволяет незамедлительно реагировать на возникновение стресса и также быстро возвращаться к нормальному росту.

Становится ясным, что переход к стационарной фазе роста является естественным механизмом защиты бактериальной культуры от стресса и голода. В этих условиях происходит изменение структуры клетки на всех уровнях организации, направленное на выживание не только отдельных клеток, но и популяции в целом. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 14-14-00072).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finkel S.E. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 2. P. 113–120.
2. Pin C., Baranyi J. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 8. P. 2534–2536.
3. Llorens J.M.N., Tormo A., Martínez-García E. // FEMS Microbiology Rev. 2010. V. 34. № 4. P. 476–495.
4. Luijsterburg M.S., Noom M.C., Wuite G.J.L., Dame R.T. // J. Structural Biol. 2006. V. 156. № 2. P. 262–272.
5. Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 20. P. 6361–6370.
6. Nair S., Finkel S.E. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 13. P. 4192–4198.
7. Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. // Genes Dev. 1992. V. 6. № 12b. P. 2646–2654.
8. Wolf S.G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. // Nature. 1999. V. 400. № 6739. P. 83–85.
9. Ilari A., Ceci P., Ferrari D., Rossi G.L., Chiancone E. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 40. P. 37619–37623.
10. Cosgriff S., Chintakayala K., Chim Y.T.A., Chen X., Allen S., Lovering A.L., Grainger D.C. // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. № 5. P. 1289–1300.

11. Kahramanoglou C., Prieto A.I., Khedkar S., Haase B., Gupta A., Benes V., Fraser G.M., Luscombe N.M., Seshasayee A.S.N. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 886.
12. Ishihama A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. V. 54. № 1. P. 499–518.
13. Reznikoff W.S., Siegele D.A., Cowing D.W., Gross C.A. // *Annu. Rev. Genet.* 1985. V. 19. № 1. P. 355–387.
14. Maciag A., Peano C., Pietrelli A., Egli T., Bellis G.D., Landini P. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 13. P. 5338–5355.
15. Arnosti D.N., Chamberlin M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 3. P. 830–834.
16. Hunt T.P., Magasanik B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 24. P. 8453–8457.
17. Straus D.B., Walter W.A., Gross C.A. // *Nature.* 1987. V. 329. № 6137. P. 348–351.
18. Rhodius V.A., Suh W.C., Nonaka G., West J., Gross C.A. // *PLoS Biol.* 2005. V. 4. № 1. P. e2.
19. Enz S., Braun V., Crosa J.H. // *Gene.* 1995. V. 163. № 1. P. 13–18.
20. Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F., Hengge R. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 5. P. 1591–1603.
21. Gaal T., Ross W., Estrem S.T., Nguyen L.H., Burgess R.R., Gourse R.L. // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 42. № 4. P. 939–954.
22. Typas A., Hengge R. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. № 3. P. 1037–1051.
23. Mika F., Hengge R. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 22. P. 2770–2781.
24. Lange R., Hengge-Aronis R. // *Genes Dev.* 1994. V. 8. № 13. P. 1600–1612.
25. Mukhopadhyay S., Audia J.P., Roy R.N., Schellhorn H.E. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 2. P. 371–381.
26. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 24. P. 7982–7989.
27. Cunnig C., Brown L., Elliott T. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 17. P. 4564–4570.
28. Brescia C.C., Kaw M.K., Sledjeski D.D. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 339. № 3. P. 505–514.
29. Lease R.A., Belfort M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 18. P. 9919–9924.
30. Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 9. P. 1143–1151.
31. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 20. P. 6061–6068.
32. Majdalani N., Hernandez D., Gottesman S. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 46. № 3. P. 813–826.
33. Trotochaud A.E., Wassarman K.M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 4978–4985.
34. Jishage M., Kvint K., Shingler V., Nyström T. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 10. P. 1260–1270.
35. Jishage M., Ishihama A. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 12. P. 3768–3776.
36. Gyaneshwar P., Paliy O., McAuliffe J., Jones A., Jordan M.I., Kustu S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 9. P. 3453–3458.
37. Typas A., Barembruch C., Possling A., Hengge R. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 6. P. 1569–1578.
38. Schweder T., Lee K.H., Lomovskaya O., Matin A. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 2. P. 470–476.
39. Santos J.M., Freire P., Mesquita F.S., Mika F., Hengge R., Arraiano C.M. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 60. № 1. P. 177–188.
40. Bougdour A., Wickner S., Gottesman S. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 7. P. 884–897.
41. Zhou Y., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 19. P. 7022–7025.
42. Zgurskaya H.I., Keyhan M., Matin A. // *Mol. Microbiol.* 1997. V. 24. № 3. P. 643–651.
43. Tani T.H., Khodursky A., Blumenthal R.M., Brown P.O., Matthews R.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 21. P. 13471–13476.
44. Zinser E.R., Kolter R. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 15. P. 4361–4365.
45. Calvo J.M., Matthews R.G. // *Microbiol. Rev.* 1994. V. 58. № 3. P. 466–490.
46. Gottesman S. // *Trends Genet.* 2005. V. 21. № 7. P. 399–404.
47. Majdalani N., Cunnig C., Sledjeski D., Elliott T., Gottesman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 21. P. 12462–12467.
48. Johansen J., Rasmussen A.A., Overgaard M., Valentin-Hansen P. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 364. № 1. P. 1–8.
49. Borek E., Rockenbach J., Ryan A. // *J. Bacteriol.* 1956. V. 71. № 3. P. 318–323.
50. Cashel M., Kalbacher B. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 9. P. 2309–2318.
51. Boutte C.C., Crosson S. // *Trends Microbiol.* 2013. V. 21. № 4. P. 174–180.
52. English B.P., Hauryliuk V., Sanamrad A., Tankov S., Dekker N.H., Elf J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 31. P. E365–E373.
53. Murray D.K., Bremer H. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 259. № 1. P. 41–57.
54. Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R.L. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. № 4. P. 673–688.
55. Starosta A.L., Lassak J., Jung K., Wilson D.N. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. V. 38. № 6. P. 1172–1201.
56. Zvereva M.I., Ivanov P.V., Teraoka Y., Topilina N.I., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Kalkum M., Nierhaus K.H., Shpanchenko O.V. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 47702–47708.
57. Neubauer C., Gillet R., Kelley A.C., Ramakrishnan V. // *Science.* 2012. V. 335. № 6074. P. 1366–1369.
58. Chadani Y., Ono K., Ozawa S., Takahashi Y., Takai K., Nanamiya H., Tozawa Y., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 78. № 4. P. 796–808.
59. Chadani Y., Ono K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 3. P. 772–785.
60. Polikanov Y.S., Blaha G.M., Steitz T.A. // *Science.* 2012. V. 336. № 6083. P. 915–918.
61. Zhang J., Zhang Y., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 32300–32306.
62. Amitai S., Kolodkin-Gal I., Hananya-Meltabashi M., Sacher A., Engelberg-Kulka H. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000390.
63. Moll I., Engelberg-Kulka H. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. № 11. P. 493–498.
64. Nyström T. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. V. 58. № 1. P. 161–181.
65. Akerlund T., Nordström K., Bernander R. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 23. P. 6791–6797.
66. Santos J.M., Lobo M., Matos A.P.A., De Pedro M.A., Arraiano C.M. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. № 6. P. 1729–1740.
67. Reeve C.A., Bockman A.T., Matin A. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 157. № 3. P. 758–763.
68. Hayes C.S., Low D.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2009. V. 12. № 6. P. 667–673.
69. Levin B.R., Rozen D.E. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. № 7. P. 556–562.
70. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. // *Cell.* 2007. V. 130. № 5. P. 797–810.
71. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y, et al. // *Science.* 2011. V. 334. P. 982–986.

УДК 577.151.34; 577.151.64

Изучение функциональных и аллостерических сайтов в суперсемействах белков

Д. А. Суплатов^{1,2}, В. К. Швядас^{1,2*}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

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

Поступила в редакцию 19.08.2015

РЕФЕРАТ К важнейшим факторам регуляции функциональных свойств белков (ферментов) относится их взаимодействие с различными низкомолекулярными соединениями, а также белок-белковые взаимодействия. К настоящему времени наиболее хорошо изучены молекулярные механизмы действия лигандов, которые связываются в функциональных сайтах белков (активных центрах ферментов), в то время как механизмы аллостерической регуляции или связывания в других центрах изучены недостаточно. Исследования последнего времени показывают, что аллостерия может быть свойством практически всех белков, и для систематического анализа организации и роли различных сайтов, установления взаимосвязи между их структурой, функцией и регуляцией необходимы новые подходы. Современные методы компьютерной биологии, биоинформатики и молекулярного моделирования позволяют вести поиск новых центров связывания регуляторных лигандов, изучать особенности их структурной организации, сходство различных сайтов в гомологичных белках, молекулярные механизмы аллостерии, а также взаимосвязи функции и регуляции. Установление эволюционных взаимосвязей между различными центрами связывания в суперсемействах белков, открытие новых функциональных, аллостерических и регуляторных сайтов с использованием вычислительных подходов должны улучшить наше понимание структурно-функциональных взаимосвязей в белках, предоставить новые возможности для создания лекарственных средств и дизайна более эффективных биокатализаторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА центры связывания, каталитический сайт, аллостерический сайт, функция, регуляция, структурно-функциональные взаимосвязи, биоинформатика.

СОКРАЩЕНИЯ PDB – Protein Data Bank; РНКП – ДНК-зависимая РНК-полимераза; МД – молекулярная динамика; СПП – специфическая позиция подсемейства.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение взаимосвязи структуры и функции белка – одна из актуальных задач современной биохимии, сложность которой заключается в том, что сходство структуры не означает тождественности функций. При общей укладке полипептидной цепи белки могут обладать принципиально разными свойствами [1, 2], в то время как одну и ту же функцию могут выполнять белки с различной структурой [3]. Специфические белок-белковые взаимодействия и распознавание низкомолекулярных соединений лежат в основе функционирования живых систем. Для понимания молекулярных механизмов этих процессов и структурно-функциональных взаимосвязей в белках необходимо изучать структурную орга-

низацию конкретных сайтов, ответственных за эти взаимодействия и связывание различных лигандов (субстратов, ингибиторов, эффекторов) [4]. Анализ карманов и полостей на поверхности глобул, формирующих сайты связывания с уникальными свойствами, и их функциональная классификация должны привести к более глубокому пониманию общих закономерностей функционирования белков, предсказания функции новых ферментов, целенаправленного изменения свойств белков/ферментов дикого типа, а также дизайна лекарственных средств.

В большинстве работ изучение свойств белков фокусируется на анализе их функциональных сайтов – активных центров ферментов, каналов мембранных транспортных белков, ДНК- и белоксвязывающих

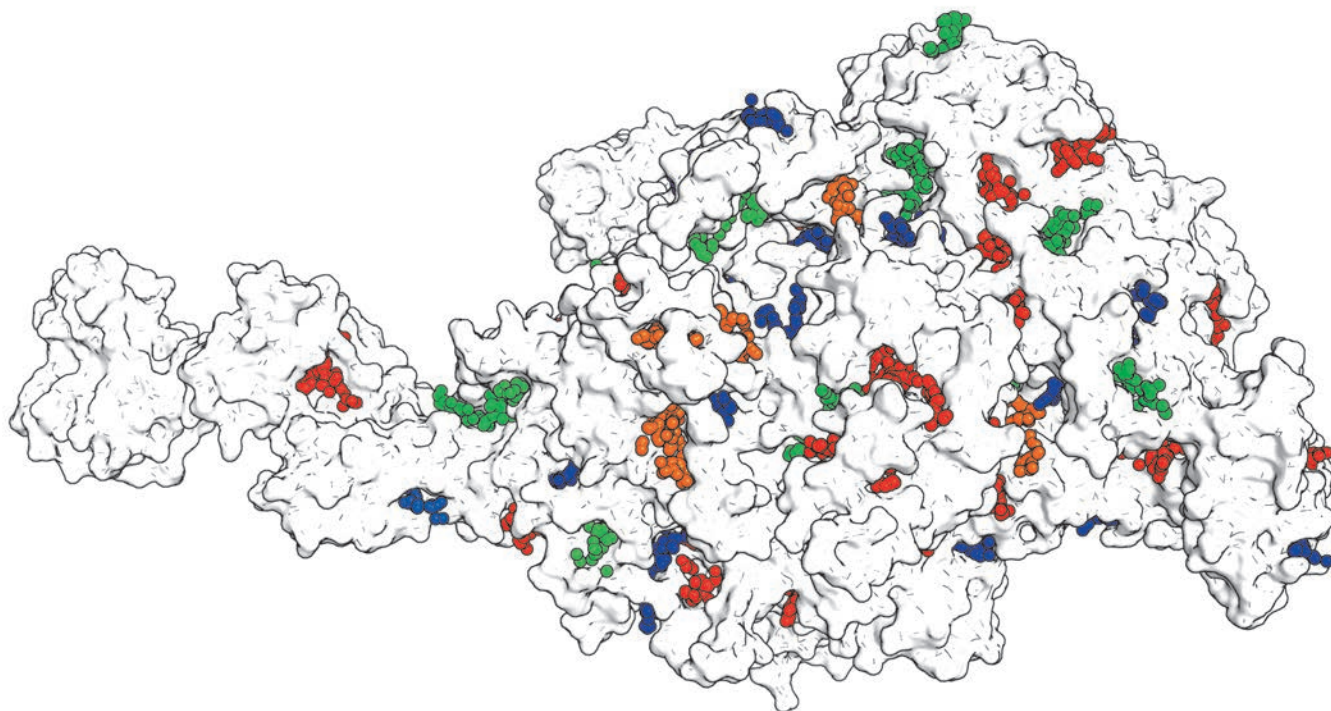


Рис. 1. Потенциальные сайты связывания низкомолекулярных эффекторов в структуре бактериальной РНКП. Скопление шариков одного цвета указывает на местонахождение потенциального сайта на поверхности фермента и соответствует центрам α -сфер, которые заполняют пространство соответствующей полости связывания (см. «Приложение»). Рисунок подготовлен с помощью программы PyMol на основании кристаллографической структуры 1YNN из PDB

участков различных регуляторных белков. Однако за последние годы накоплено множество свидетельств явления аллостерии – регуляции функции белков посредством связывания низкомолекулярных эффекторов в регуляторных сайтах, топологически независимых от функциональных сайтов [5]. Эти сведения стимулируют интерес к изучению регуляции функции биологических макромолекул при связывании различных лигандов в аллостерических центрах. Созданы экспериментальные и компьютерные подходы к поиску новых регуляторных центров в структурах белков. Предпринимаются попытки понять взаимосвязь между функциональными и регуляторными сайтами и изучить молекулярные механизмы взаимного влияния центров связывания, находящихся на значительном расстоянии друг от друга [6]. Обнаружены низкомолекулярные ингибиторы, селективно связывающиеся в аллостерических сайтах ряда белков, ассоциированных с различными заболеваниями человека [7]. Однако особое внимание к этой теме связано не столько с уникальными особенностями функционирования конкретных белков, сколько с общей ролью этих процессов в регуляции живых систем. Есть основания полагать, что алло-

стерия представляет собой весьма универсальное явление, присущее большинству белков [8]. Интерес вызывает не только фундаментальное значение аллостерии, но и возможность практического использования этого явления в биотехнологии и биомедицине. За последнее время показано, что белки и ферменты наряду с весьма хорошо известными функциональными сайтами (активными центрами) и аллостерическими сайтами содержат значительное количество практически неизученных участков связывания. На *рис. 1* представлена структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы – ключевого фермента синтеза РНК во всех живых организмах [9, 10]. Поверхность этого крупного полисубъединичного фермента покрыта большим количеством полостей – потенциальных сайтов связывания. Среди них можно увидеть как активный центр, содержащий каталитические остатки и участок связывания ДНК, так и несколько известных аллостерических сайтов, способных связывать различные низкомолекулярные лиганды [11, 12]. При этом роль остальных участков связывания, а их большинство, остается неизвестной. Насколько важны эти сайты для функционирования фермента? Какие сайты связывания играют физиологическую

роль, а какие можно приспособить для создания белка с новыми практически значимыми свойствами? Как оценить потенциал использования каждого отдельного сайта для регуляции функции?

В данном обзоре обсуждается изучение структурно-функциональных взаимосвязей в белках на основании анализа различных сайтов связывания в их структурах. Рассмотрены экспериментальные и компьютерные подходы к поиску и изучению новых центров связывания регуляторных лигандов, молекулярные механизмы аллостерии, а также взаимосвязь функции и регуляции в белках. Увеличение размеров публичных баз данных открывает доступ к новой информации о геномных последовательностях, структуре и функции большого числа белков. В этой связи новые возможности предоставляют методы биоинформатики, которые позволяют изучать свойства ферментов не по отдельности, а системно, в суперсемействах. Анализ структурной информации и экспериментальных данных о функциональных свойствах отдельных белков в их взаимосвязи с близкими, а также эволюционно удаленными гомологами, должен позволить лучше понять структурно-функциональные взаимосвязи в белках/ферментах и обнаружить новые механизмы регуляции их функциональных свойств.

ЯВЛЕНИЕ АЛЛОСТЕРИИ

Аллостерию принято определять как процесс регуляции функции белка путем связывания эффектора – лиганда или другого белка – в сайте на поверхности структуры, который называют аллостерическим центром [6]. В свою очередь, слово «аллостерический» происходит от греческих корней *allos* (другой) и *stereos* (твердый) и может быть переведено как «иная форма», чтобы подчеркнуть взаимосвязь конформационных состояний между структурно удаленными сайтами в белках [8]. Известно, что аллостерическая регуляция метаболизма важна для функционирования живых клеток, а аллостерические эффекторы могут быть как ингибиторами, так и активаторами функции белков [13].

Исторически под аллостерией понимали кооперативный эффект в полисубъединичных белках, функционирующих на уровне четвертичной структуры. В 1965 году на основании 24 известных на тот момент случаев была сформулирована «согласованная» модель аллостерии, называемая также моделью MWC (по заглавным буквам фамилий авторов Monod–Wyman–Changeux) [14]. Скачкообразное увеличение сродства гемоглобина к кислороду по мере его насыщения, описываемое S-образной кривой, позволило предположить кооперативный эффект. Однако полученная в 1960 году с разрешением 5.5 Å

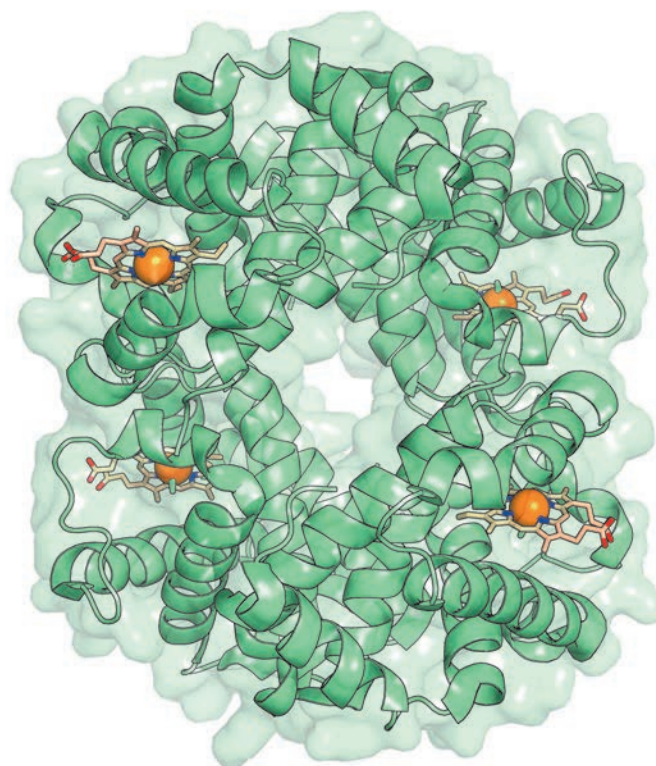


Рис. 2. Трехмерная структура гемоглобина человека. Молекулы гема (оранжевый) показаны в каждой субъединице тетрамера. Рисунок подготовлен с помощью программы PyMol на основании структуры 1GZX из PDB

структура гемоглобина показала, что молекулы гема, связывающие кислород, расположены на значительном расстоянии друг от друга в разных субъединицах белка (рис. 2) [15]. Это позволило сделать вывод о том, что в основе организации аллостерических белков лежит симметричное расположение субъединиц, причем существуют по меньшей мере два конформационных состояния каждой субъединицы – R (от англ. *relaxed*) и T (от англ. *tense*), которые, в случае гемоглобина, характеризуются высоким и низким сродством к кислороду соответственно. Переход от одной конформации к другой в результате связывания лиганда происходит во всех субъединицах согласованно и таким образом, что олигомерный белок не существует в гибридном состоянии (RT). Эта упрощенная модель позволила кинетически описать наблюдаемое увеличение сродства гемоглобина к кислороду по мере его насыщения [14]. Однако объяснить этот феномен на молекулярном уровне удалось только после проведения ряда структурных исследований [16, 17]. Стало понятно, что присоединение (отщепление) кислорода сопровождается значительными измене-

ниями пространственной организации функционального центра и разрывом (образованием) нескольких солевых мостиков, а возникающее при этом смещение субъединиц друг относительно друга приводит к тому, что эффект от связывания первой молекулы кислорода распространяется на весь тетрамер. Таким образом, присоединение и отщепление одной молекулы кислорода в одной субъединице инициирует соответствующий процесс в остальных субъединицах, что делает гемоглобин эффективным переносчиком кислорода по градиенту давления. Подобные кооперативные эффекты в гомоолигомерных белках/ферментах – один из наиболее известных примеров аллостерии. В этом случае аллостерическим центром по отношению к активному центру одной субъединицы является активный центр другой субъединицы, при этом связывание второй молекулы субстрата (или его аналога) приводит к аллостерическому влиянию на центр связывания первой молекулы субстрата и может не сопровождаться ее каталитическим превращением. В соответствии с «последовательной», или KNF-моделью (по заглавным буквам фамилий авторов Koshland–Nemethy–Filmer) [18], субъединицы в рамках мультимера изменяют свою конформацию поочередно, т.е. связывание лиганда меняет конформацию и свойства соответствующей субъединицы, что, в свою очередь, способно влиять на ее соседей. Иными словами, связывание лигандов последовательно приводит к изменению конформаций субъединиц. Такая модель описывает отрицательную кооперативность, которая наблюдается, например, в глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе при связывании кофермента NAD^+ , когда присоединение кофактора в активном центре одной субъединицы ослабляет его связывание в соседней вследствие перестройки внутри- и межсубъединичных контактов [19, 20]. Наблюдаемое свойство способствует поддержанию активности фермента на постоянном уровне вне зависимости от концентрации лиганда в среде. Хотя с целью выработки более общих закономерностей была предпринята попытка объединить модели MWC и KNF [21], дальнейшие исследования показали, что молекулярные механизмы аллостерической регуляции сложны и разнообразны, и ни одна из предложенных моделей не описывает исчерпывающе явление аллостерии.

В настоящее время можно считать общепринятым, что аллостерической регуляции подвержены не только полисубъединичные, но и мономерные белки, а аллостерическими лигандами служат прежде всего низкомолекулярные соединения, которые связываются в регуляторном центре, топографически независимом от функционального центра. Кроме того, к аллостерическим эффектам стали относить

регуляторное влияние, вызываемое белок-белковыми взаимодействиями, фосфорилированием и даже точечными мутациями. Многообразие конкретных примеров аллостерической регуляции белков и ферментов хорошо иллюстрирует ряд недавних статей [5, 7, 22]. Высказано предположение, что аллостерия может быть неотъемлемым свойством практически всех белков [8], исключение могут составить лишь структурные белки, жесткая конформация которых ограничивает их подвижность и возможности регуляции. Действительно, экспериментальные исследования все чаще обнаруживают аллостерию в ферментах, которые раньше не считались аллостерическими. Фосфофруктокиназа, катализирующая одну из ключевых стадий гликолиза, является примером белка со сложно организованной регуляцией, осуществляемой различными эффекторами. Аллостерия описана в ферментах этого суперсемейства – прокариотических [23] и эукариотических, причем последние имеют значительно большие размеры глобул вследствие дупликаций, вставок и мутаций предкового прокариотического гена, которые способствовали появлению новых аллостерических центров [24]. В то же время свойства фосфофруктокиназы из миксомицета *Dictyostelium discoideum* отличаются от свойств ее гомологов, и этот белок не считается аллостерическим. Однако делеция одного С-концевого остатка лейцина приводит к проявлению у мутантного белка аллостерических свойств, присущих другим представителям суперсемейства [25]. В качестве другого примера можно привести пируваткиназу [26]. У млекопитающих известно четыре изоформы этого фермента – L, R, M_1 и M_2 . Все изоформы, за исключением M_1 , аллостерические и характеризуются положительной гомотропной кооперативностью по отношению к субстрату, а также положительной гетеротропной кооперативностью по отношению к фруктозо-1,6-дифосфату. При этом изоформы M_1 и M_2 образуются в результате альтернативного сплайсинга одного гена и отличаются на 23 аминокислотных остатка, локализованных в области межсубъединичных контактов, а также участвующих в образовании центра связывания фруктозо-1,6-дифосфата. Внесение двух точечных мутаций в структуру изоформы M_1 , одной – в область межсубъединичного контакта [27], другой – в область центра связывания фруктозо-1,6-дифосфата [26], приводит к проявлению аллостерических свойств, характерных для других гомологов. Еще одним примером служит миоглобин, паралог¹ гемоглобина, существующий в виде трех основных конфор-

¹ Паралоги – эволюционно родственные белки, которые произошли вследствие дупликации предкового гена.

мационных состояний с разными каталитическими свойствами, так называемых таксономических под-состояний, внутри которых могут выделяться дополнительные конформационные вариации [28]. Предполагается, что миоглобин способен аллостерически контролировать протекание бимолекулярных реакций с двухатомными субстратами (например, NO и O₂) за счет изменения геометрии консервативных полостей, примыкающих к активному центру. Интересно отметить, что во всех этих случаях аллостерическая регуляция обнаруживалась в белках, у гомологов которых это явление было описано ранее. Эти примеры говорят не только о широкой распространенности аллостерической регуляции, но и об общих механизмах этого явления в рамках суперсемейств белков. Рассмотренные случаи указывают также на возможность тонкой настройки аллостерии за счет нескольких точечных мутаций, но при этом подчеркивают сложную взаимосвязь функции и регуляции.

По современным представлениям структуру белка предлагается рассматривать в рамках сложных статистических ансамблей конформеров, которые, совершая локальные перегруппировки, находятся в постоянном движении [6, 29]. В этом контексте аллостерический эффект обусловлен перераспределением конформационных состояний [8]. Иными словами, связывание аллостерического эффектора приводит к популяционному сдвигу в сторону таких конформационных состояний макромолекулы, которые значительно отличаются функционально от нативного [30]. В свою очередь, в традиционно неаллостерических белках альтернативные конформа-

ции центров связывания и функционально важные конформационные переходы на сегодняшний день могут быть неизвестны. Но это не означает, что нельзя подобрать лиганд или особые условия среды, способные вызвать конформационный сдвиг и проявить аллостерические свойства в неаллостерических белках. В принципе, практически любое вещество, связавшись на поверхности белка, может вызвать популяционный сдвиг его конформаций, вопрос состоит лишь в эффективности такого сдвига и его влиянии на функцию [8]. Этот вопрос требует дальнейшего изучения на более широкой выборке белков. Однако конформационные изменения, связанные с аллостерической регуляцией, трудно выявить с помощью современных экспериментальных методов. Разработанные в последнее время подходы биоинформатики и компьютерной биологии предоставляют новые возможности для решения этой задачи.

ПОИСК ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ В БЕЛКАХ

Предсказание центров связывания в белках на основании информации об их структуре представляет собой новое направление в компьютерной биологии [31]. Для поиска полостей и карманов на поверхности структуры белков предложены разнообразные геометрические подходы, основанные на использовании пространственных критериев (таблица). Поскольку в большинстве случаев программы позволяют выявить несколько потенциальных сайтов, предпринимаются попытки их классифицировать с использованием различных геометрических параметров – размера, глубины и ориентации [32–34], а также различных статистических оценок, учиты-

Интернет-сервисы для предсказания сайтов связывания в структурах белков и их ранжирования по функциональной значимости

Название	Адрес в сети Интернет	Алгоритм поиска сайтов в структуре	Алгоритм ранжирования сайтов
Fpocket [35]	http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/ > Programs > Structure > Pockets > fpocket	Геометрический, с использованием диаграмм Вороного и построением α -сфер	Статистический, оценивается схожесть с известными сайтами связывания низкомолекулярных веществ
POCASA [33]	http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/	Геометрический, с прокаткой сферических проб по поверхности белка	Геометрический, с учетом положения и размера сайта
pocketZebra [39]	http://biokinet.belozersky.msu.ru/pocketzebra	Геометрический, с использованием диаграмм Вороного и построением α -сфер	Биоинформатический, анализ специфических позиций подсемейств в суперсемействах белков
SiteHound [38]	http://scbx.mssm.edu/sitehound/sitehound-web/Input.html	Энергетический, оценивается энергия взаимодействия аминокислот на поверхности с углеродной или фосфатной пробой	Энергетический, оценивается энергия взаимодействия аминокислот на поверхности с углеродной или фосфатной пробой
LIGSITE ^{csc} [41]	http://projects.biotec.tu-dresden.de/pocket/	Геометрический, на основе расчета поверхности Кюннолли	Биоинформатический, анализ консервативных позиций

вающих физико-химические свойства известных центров связывания лигандов [35, 36]. Альтернативу геометрическим методам представляют энергетические подходы, в которых предсказание и ранжирование сайтов основано на расчете энергии связывания небольших органических молекул (проб) на поверхности белка [37, 38]. Все эти подходы, основываясь на структурной информации, способны быстро и эффективно обнаружить полости и карманы потенциальных сайтов связывания, однако не дают представления об их функциональной значимости и структуре комплементарных лигандов.

В процессе эволюции от общего предка одни свойства белков сохраняются, в то время как другие претерпевают изменения в результате естественного отбора, что приводит к формированию функционального разнообразия. Так, гомологичные ферменты одного суперсемейства могут обладать общей структурной организацией и химизмом катализируемой реакции, но отличаться по другим функциональным свойствам (субстратная специфичность, энантио- и региоселективность, тип химического превращения), а также принципам их регуляции. Существенный рост публичных баз данных, содержащих геномную и структурную информацию о белках/ферментах, позволяет проводить масштабный сравнительный анализ в рамках суперсемейств – совокупностей как близких, так и эволюционно удаленных гомологов. Не все позиции в структуре белков одинаково подвержены изменчивости в процессе эволюции, что отражает различия в давлении отбора на остатки с разной функциональной ролью. Этот факт позволяет использовать биоинформатический анализ суперсемейств белков для поиска эволюционных закономерностей, характерных для аминокислотных остатков функциональных и регуляторных центров связывания [39] (таблица). Полностью консервативные позиции играют ключевую роль в функции, общей для всего суперсемейства, например, принимают участие в каталитическом механизме действия ферментов. Нужно отметить, что не всегда каталитические аминокислоты в суперсемействе полностью консервативны, кроме того, известны случаи миграции каталитических аминокислот в структурах гомологичных белков [2, 40]. Так, например, нуклеофил каталитической триады α/β -гидролаз может быть представлен как серином, так и цистеином или аспаргатом, а каталитическая кислота может располагаться по меньшей мере в двух альтернативных позициях основной полипептидной цепи. Тем не менее показано, что консервативность остатков в полостях на поверхности белков может служить критерием при аннотации функциональных центров [41–43], и это свойство может быть исполь-

зовано для характеристики широкого круга ферментов [44–46]. Фактически, описание любого нового белка с неизвестной функцией разумно начинать с его сравнительного анализа с ближайшими гомологами и расчета консервативных позиций в колонках множественного выравнивания. Роль наиболее консервативных остатков, обнаруженных при таком анализе, может быть проверена экспериментально посредством внесения точечных мутаций и оценке их влияния на каталитические свойства. Благодаря критерию консервативности предсказание функциональных центров в новом белке с неизвестной функцией возможно даже при отсутствии данных о его трехмерной структуре при условии, что доступна аннотация функциональных центров в его гомологах. На сегодняшний день такая информация о достаточно большом числе белков из различных суперсемейств собрана в публичных базах данных (см. следующую главу). Таким образом, комплексное использование геометрических структурных подходов и биоинформатического анализа делает поиск функциональных центров в белках более эффективным.

Сравнительное исследование белков позволило сделать вывод о том, что аллостерические сайты характеризуются меньшим содержанием консервативных позиций и более высоким содержанием переменных позиций [47]. Показано также, что мутагенез переменных позиций в аллостерических центрах приводит к изменению аллостерического эффекта, в то время как замена консервативных позиций в этих же центрах в основном приводит к потере каталитической функции. Эти результаты говорят о малой пригодности критерия консервативности при поиске регуляторных центров и свидетельствуют о важной роли переменных позиций в связывании аллостерических лигандов и регуляции функциональных свойств в суперсемействах белков. В этом отношении особый интерес представляют специфические позиции подсемейств (СПП) – консервативные внутри функциональных подсемейств, но различающиеся между ними [48, 49]. Присутствие СПП характерно как для каталитических, так и аллостерических сайтов и может быть эффективным критерием идентификации функциональных и регуляторных центров в структурах белков [39]. Поиск статистически значимых СПП может помочь понять разницу в строении участков связывания в родственных белках. Так, например, ДНК-зависимая РНК-полимераза (РНКП) является ключевым ферментом транскрипции, который присутствует во всех живых системах. Каталитическая основа бактериального фермента состоит из субъединиц $\alpha_2\beta\beta'\omega$ и характеризуется высокой степенью сходства по структуре и функции с гомологами всех известных орга-

низмов. Подтверждено, что бактериальная РНКП служит мишенью для противомикробных средств [12]. Рифампицин – антибиотик «первого эшелона» при туберкулезе – селективно ингибирует транскрипцию в *Mycobacterium tuberculosis* за счет взаимодействия с аллостерическим центром, расположенным в β -субъединице фермента. Взаимодействие ингибитора с бактериальным ферментом напрямую блокирует элонгацию в патогене, не затрагивая при этом родственный фермент человека [50]. Биоинформатический анализ суперсемейства РНКП показывает, что селективность связывания рифампицина с ферментом бактерий обусловлена наличием специфических позиций подсемейств в соответствующем участке связывания, которые отличаются у прокариот и человека (рис. 3). Этот пример свидетельствует о том, что изучение роли СПП в формировании сайтов связывания регуляторных лигандов позволяет лучше понять молекулярные механизмы специфического узнавания аллостерических эффекторов и закономерности функциональной регуляции в семействах белков.

ПУБЛИЧНЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ

Возможность быстрого получения информации из открытых источников в сети Интернет является важным фактором развития современной науки. В этом контексте особое место занимают публичные базы данных.

База данных каталитических сайтов Catalytic Site Atlas (CSA) – один из основных источников информации о ферментах [51]. В основе CSA лежат экспериментальные данные о 1000 каталитически активных белков с разными свойствами, а методы поиска сходства по геномным последовательностям применяются для того, чтобы с высокой степенью значимости аннотировать каталитические остатки в других белках на основании критерия консервативности. В результате использования методов биоинформатики база данных CSA содержит данные об активных центрах нескольких десятков тысяч белков с известной структурой.

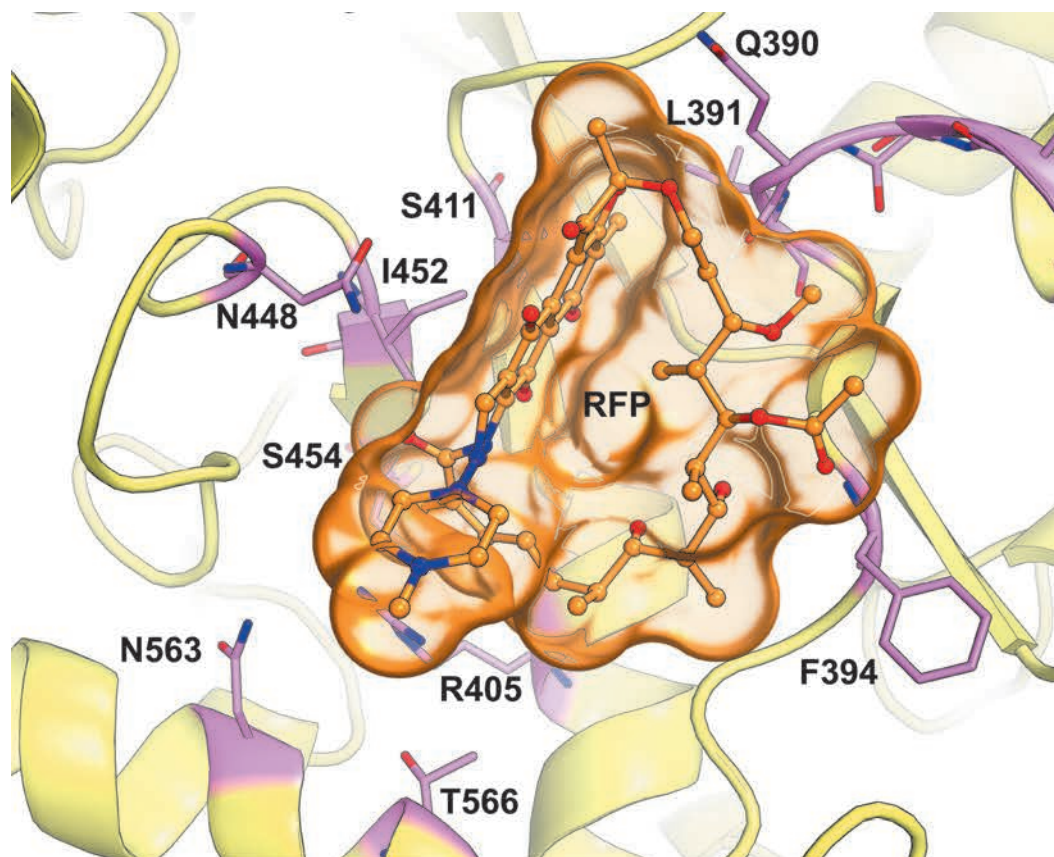
Объем знаний об аллостерических белках не столь значителен, что, по всей видимости, связано с недостатком структурной информации и сложностями при определении аллостерических сайтов. Однако и в этой области достигнут значительный прогресс. Если 50 лет назад (когда была предложена первая модель кооперативности) были известны 24 аллостерических белка, то сегодня насчитываются сотни таких примеров. Недавнее создание публичной базы данных аллостерических центров Allosteric Database (ASD) стало первой попыткой обобщить массив соответствующей опубликованной информации [52].

На сегодняшний день база ASD насчитывает почти 2000 сайтов, однако далеко не все сведения подкреплены кристаллографической информацией о структуре белка в комплексе с эффектором, а некоторые аннотации и вовсе неоднозначны. Тем не менее можно ожидать, что систематизация экспериментального материала о структуре и функции аллостерических центров будет продолжаться, в том числе и в рамках других публичных баз данных.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ

Не вызывает сомнений тот факт, что конформационные изменения в структуре белка, обусловленные связыванием лиганда в аллостерическом центре, в конечном итоге приводят к изменению функциональных свойств. Однако не много известно о конкретных молекулярных механизмах этого явления. Как объяснить кооперативность, наблюдаемую при связывании различных лигандов, и как предсказать взаимодействие между сайтами в белках, в которых аллостерия еще не описана? В последние годы предпринято несколько попыток понять взаимосвязь функции и регуляции [6]. В основе этих подходов лежат компьютерные методы поиска корреляций – структурных или эволюционных – между событиями, происходящими при связывании лигандов в топологически независимых центрах на поверхности белков. Рассмотрим несколько таких примеров.

Структурные изменения, возникающие при связывании лиганда, непосредственно связаны с конформационной подвижностью белковой глобулы. Молекулярная динамика зарекомендовала себя как эффективный метод изучения структурных изменений в белках [53, 54], в том числе согласованных флуктуаций атомов, происходящих в результате коллективного движения [55]. Так, расчет матриц ковариаций флуктуации атомов вдоль МД-траекторий был использован для изучения молекулярных механизмов аллостерической регуляции белка-супрессора опухолевого роста Хиппеля–Линдау (pVHL) [56]. pVHL в свободном состоянии нестабилен и существует в виде так называемой «расплавленной глобулы». Белок стабилизируется при взаимодействии с элонгинами С и В, которые вместе образуют лигандраспознающий компонент для связывания фактора транскрипции HIF в составе ферментного комплекса убиквитинлигазы E3 (рис. 4). С использованием МД показано, что интерфейс между двумя доменами α и β в pVHL представляет собой наименее стабильный участок белка. Были отобраны такие аминокислотные остатки, подвижность которых вдоль МД-траекторий в наибольшей степени коррелирует с движением остатков из нестабильной междоменной области pVHL. Молекулярное моделирова-



	390	411	447	455	562	568
PDB: 1YNN	QLSQFK DETNP LSSLRHKRRIS		ANIGLITSL		SNMQTQA	
RPOB_THEAQ	QLSQFK DETNP LSSLRHKRRIS		ANIGLITSL		SNMQTQA	
RPOB_NITEU	QLSQFMDQ TNPLSEVTHKRRIS		PNIGLINSL		SNMQRQA	
RPOB_AZOSE	QLSQFMDQ TNPLSEITHKRRVS		PNIGLINSL		ANMQRQA	
RPOB_GEOTN	QLSQFMDQ TNPLAELTHKRRLS		PNIGLINSL		ANMQRQA	
RPOB_CHAVU	PLCQFMDQ TNPLAEITHKRRIS		QNAGLVSSL		SNMQRQA	
RPOB_STRPN	QLSQFMDQ HNPLSELCHKRRIS		PNIGLINNL		ANMQRQA	
RPOB_MACCJ	QLSQFMDQ ANPLAELTHKRRIS		PNIGLINSL		ANMQRQA	
RPOB_MYCVP	QLSQFMDQ NNPLSGLTHKRRIS		PNIGLIGSL		ANMQRQA	
RPOB_MYCUA	QLSQFMDQ NNPLSGLTHKRRIS		PNIGLIGSL		ANMQRQA	
RPOB_MYCLE	QLSQFMDQ NNPLSGLTHKRRIS		PNIGLIGSL		ANMQRQA	
RPOB_MYCTA	QLSQFMDQ NNPLSGLTHKRRIS		PNIGLIGSL		ANMQRQA	
<hr/>						
RPA2_HUMAN	GLCVVADK LNFI RYLSHFRCVH		EPCGLM NHL		CQMGKQT	
RPB2_HUMAN	GVSQVLN R LTFAS TLSHLRRLN		HAVGLVKNL		SAMGKQA	
RPC2_HUMAN	GVTQVLS R LSYISALGMMTRIS		EACGLVKNL		CAMGKQA	
RPA2_MOUSE	GLCVVADK LNFLRYLSHFRCVH		APCGLLNHL		CQMGKQT	
RPB2_CAEL	GVSQVLN R LTYTATLSHLRRAN		QAVGLVKNL		SAMGKQA	
RPC2_DROME	GVTQVLS R LSYISALGMMTRVN		EACGLVKNL		CAMGKQA	
RPA2_RAT	GLCVVADK LNFI RYLSHFRCVH		APCGLLNHL		CQMGKQT	
RPB2_YEAST	GVSQVLN R YTSSTLSHLRRTN		QACGLVKNL		SAMGKQA	
RPOB_SULAC	GVSQLLD R TNWLSMLSHLRRVV		PNSGLVKNL		SAMAKQS	
RPB2_CANGA	GVSQVLN R YTSSTLSHLRRTN		QACGLVKNL		SAMGKQA	
NRPB2_ARATH	GVSQVLN R LTYASTLSHLRRLN		QACGLVKNL		SAMGKQA	

Рис. 3. Связывание рифампицина (RFP) в аллостерическом сайте β-субъединицы бактериальной РНКП. Показаны специфические позиции подсемейств (розовый), определенные с помощью биоинформатического анализа 271 РНКП из различных источников, и приведены соответствующие фрагменты выравнивания аминокислотных последовательностей. Интерактивная версия доступна в сети Интернет (см. «Приложение»). Рисунок подготовлен с помощью программы PyMol на основании структуры 1YNN из PDB

ние показало, что замена аминокислот в отобранных позициях на гомологичные остатки в аминокислотной последовательности более стабильного pVHL из *Caenorhabditis elegans* приводит к значительной стабилизации pVHL из человека как в свободном состоянии, так и в составе комплекса. При этом мутации остатков в областях, топологически независимых от центров связывания элонгина С и фактора транскрипции HIF, приводят к стабилизации комплекса pVHL–элонгин С и снижению энергии связывания HIF в pVHL. Авторы работы [56] делают вывод, что стабильность и эффективность связывания в pVHL могут регулироваться аллостерически с помощью лекарственных средств, мимикрирующих эффект внесенных мутаций.

Другой пример свидетельствует о пользе поиска эволюционных корреляций с использованием статистического анализа геномных последовательностей [57, 58]. Подход основан на предположении, что если два сайта в структуре белка функционально связаны, то соответствующие аминокислотные остатки в гомологичных белках должны коэволюционировать в процессе развития от общего предка и эта корреляция может быть выявлена с помощью статистического сравнения аминокислотных последовательностей. В таком случае корреляция встречаемости аминокислот в двух сайтах в структурах родственных белков может означать существование функциональной зависимости между ними. Описанный подход применили для анализа мембранного белка FesA – представителя семейства TonB-зависимых транспортных белков, функция которого заключается в перекачке железа через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий [59]. Ключевая стадия переноса железа – взаимодействие белка TonB, создающего протонный градиент, с консервативным N-концевым TonB-связывающим мотивом транспортного белка. Предполагалось, что это взаимодействие, протекающее на периплазматической стороне мембраны, вызывает конформационные изменения, которые приводят к связыванию сидерофора¹ на противоположной поверхности мембраны со стороны внеклеточного пространства и последующему импорту железа, однако конкретные механизмы этой аллостерической коммуникации между двумя центрами связывания, расположенными в разных компартментах на значительном расстоянии друг от друга, оставались неизвестными. Статистический анализ последовательностей TonB-зависимых транспортных белков обнаружил рассеянную, но связную сеть коррелирующих остатков, которая обеспечивает функцио-

¹ Сидерофор – низкомолекулярное соединение с высоким сродством к ионам железа (например, цитрат железа).

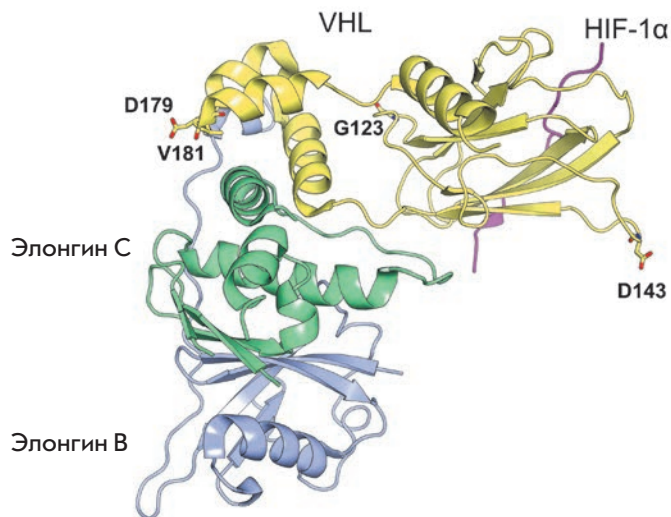


Рис. 4. Комплекс фактора транскрипции HIF (пурпурный) – белка-супрессора опухолевого роста Хиппеля–Линдау VHL (желтый) – элонгина С (зеленый) – элонгина В (синий). Домен α белка VHL взаимодействует с элонгином С, в то время как домен β связывает HIF. Показаны аминокислотные остатки, движение которых в процессе МД-траекторий в наибольшей степени коррелирует с остатками из междоменной области pVHL. Рисунок подготовлен с помощью программы PyMol на основании структуры 1LM8 из PDB для иллюстрации результатов из [56]

нальную коммуникацию между периплазматическим и внеклеточным сайтами связывания в FesA (рис. 5), а направленный мутагенез обнаруженных остатков, ни один из которых не участвует непосредственно в образовании центров связывания TonB и сидерофора, привел к нарушению транспортной функции FesA.

Основываясь на известных к этому моменту результатах, можно сделать вывод, что поиск эволюционных и структурных корреляций может служить важным инструментом изучения молекулярных механизмов аллостерической регуляции в белках.

ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ В BIOTECHNOLOGY И BIOMEDICINE

Сайты связывания субстратов/лигандов в ферментах/белках активно изучаются с целью создания новых биокатализаторов для промышленного использования (см., например, обзор [60]), а также ингибиторов, используемых в качестве лекарственных средств человека [61, 62]. В каждом случае применяются свои методы, однако в основе большинства успешных исследований лежит общий принцип, который можно назвать «стохастический анализ». Для дизай-

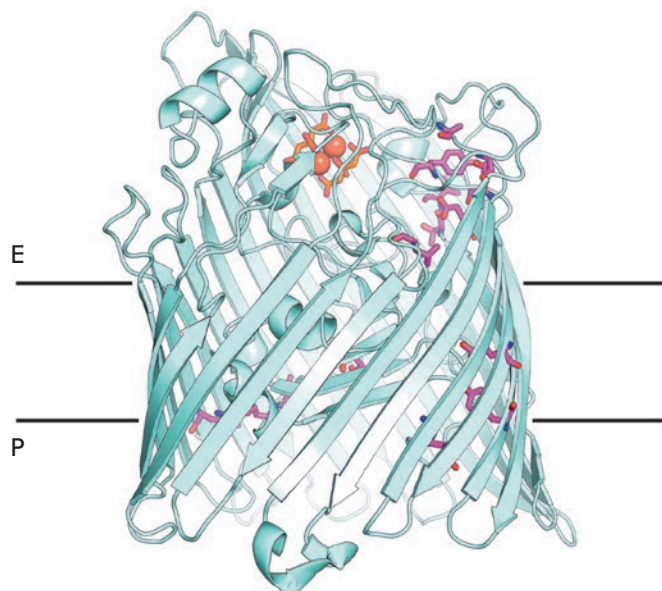


Рис. 5. Структура транспортного белка FecA внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Периплазматическое пространство (P) отделено от внеклеточного пространства (E) схематическим изображением мембраны. Ионы железа в составе цитрата железа (оранжевый) показаны в центре связывания сидерофора. Показаны коррелирующие остатки (пурпурный), участвующие в образовании сети взаимодействий, которая обеспечивает функциональную коммуникацию между периплазматическим и внеклеточным сайтами связывания в FecA. Рисунок подготовлен с помощью программы PyMol на основании структуры 1KMP из PDB для иллюстрации результатов из [59]

на белков с новыми свойствами предложены так называемые подходы «направленной эволюции» [63, 64]. Эти методы сочетают в себе случайный мутагенез структуры белка, сопряженный с последующим скринингом для отбора наиболее предпочтительных фенотипов. Мутации вносят в структуру или определенную часть структуры белка произвольным образом, после чего эффект замен оценивают экспериментально и отбирают те из них, которые приводят к улучшению нужного свойства. В последние годы стохастические подходы стали более быстрыми и эффективными за счет использования различных методов статистического анализа и компьютерной биологии [65, 66]. Однако они по-прежнему требуют значительных ресурсов, экспериментального исследования больших библиотек мутантов, разработки эффективных методов скрининга и при этом способны изучить лишь очень небольшую часть возможных изменений в структуре белка. Эффективное

применение методов случайной эволюции затруднено высокой вероятностью отрицательных мутаций и низкой вероятностью проявления функционально полезных фенотипов. Аналогичным образом дизайн новых лекарственных средств в большинстве случаев основан на слепом экспериментальном скрининге огромных библиотек низкомолекулярных соединений в качестве потенциальных ингибиторов белка-мишени [67, 68]. Хотя структуру такого случайно обнаруженного ингибитора далее можно оптимизировать с использованием экспериментальных и компьютерных подходов, это в целом чрезвычайно трудоемкий и малоэффективный подход. Так, компания GlaxoSmithKline за период с 1995 по 2001 год провела 70 высокопроизводительных экспериментальных скрининговых исследований (стоимостью около \$1 млн каждый) белков-мишеней, отобранных из различных болезнетворных бактерий, с использованием собственных коллекций потенциальных ингибиторов, содержащих 260000–530000 соединений. По результатам шестилетних исследований для дальнейших испытаний отобрали всего пять лидерных компонентов с подтвержденными эффектами [69]. Обзор опубликованных данных показывает, что в период с 1996 по 2004 год подобные исследования проводились по крайней мере 34 различными компаниями на 60 мишенях и в целом считаются неудачными [70]. Высокие затраты на экспериментальные исследования в сочетании с низкой результативностью эмпирического поиска предопределили значительное падение интереса к этой методологии.

Несмотря на кажущуюся универсальность стохастических подходов, они, как правило, направлены на изучение функциональных центров. В большинстве случаев с целью изменения каталитических свойств случайные мутации вносят в структуру активного центра фермента [71]. Аналогично, большинство разрабатываемых лекарственных средств связываются с функциональными центрами белков (см., например, [72]). Примеров практического использования аллостерических сайтов значительно меньше. Так, показано, что введение единственной мутации в структуру глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы приводит к разрушению солевого мостика вблизи активного центра и потере кооперативности при связывании NAD^+ [73]. При этом полученный препарат фермента характеризуется двукратным увеличением удельной активности. Известны лекарственные средства, которые взаимодействуют с регуляторными сайтами белков. Так, рифампицины и миксопиранины связываются в полостях субъединиц β и β' РНКП, топологически независимых от активного центра, и прямо блокируют работу фермента [12]. Связывание ингибитора до

рамапимода в аллостерическом центре р38 МАР-киназы человека и сопутствующие этому процессу конформационные перестройки приводят к блокировке связывания АТФ [74]. Ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 эфавиренц, невирапин и далавидин связываются в аллостерическом сайте на значительном расстоянии от активного центра [75]. Обобщая имеющийся опыт, следует отметить, что благодаря более высокой вариабельности в рамках суперсемейства аллостерические сайты можно считать не менее привлекательными мишенями для селективного ингибирования, чем каталитические [76].

Низкая эффективность стохастических методов стимулирует развитие компьютерных подходов к дизайну эффективных биокатализаторов и поиску селективных ингибиторов ферментов. Показано, что биоинформатический анализ эволюционных взаимосвязей в функционально разнообразных суперсемействах позволяет обнаруживать не только ключевые «горячие точки» в структурах ферментов, но и конкретные аминокислотные замены, внесение которых позволяет получать мутанты с улучшенными свойствами [54, 77–79]. Применение вычислительных подходов к дизайну белков подробно рассмотрено в недавних обзорах [80–82]. Секвенирование полных геномов основных бактериальных патогенов, в том числе *M. tuberculosis* [83], положило начало применению компьютерной геномики в медицине. Использование геномных подходов позволяет не только составить список всех потенциальных белков-мишеней в конкретном организме, но и выявить наиболее перспективные объекты для последующего экспериментального исследования [84]. Важным преимуществом такого постгеномного анализа принято считать возможность выбора мишени, которая встречается во многих, либо, наоборот, всего в нескольких бактериальных геномах. Предполагалось, что таким путем можно создавать как лекарственные средства с широким спектром действия, так и высокоспецифичные ингибиторы определенных патогенов. Кроме того, сравнительный анализ геномов бактерий и животных позволяет исключать из списка возможных мишеней такие белки, гомологи которых есть в организме человека, что может позволить избежать ситуаций, когда созданный прототип токсичен не только для бактерий, но и для человека [85]. Однако, обобщая, следует отметить, что используемые до последнего времени постгеномные методы весьма поверхностно подходили к выбору мишеней, на которые действуют лекарственные средства. Так, например, предпочтительными мишенями при поиске новых антибиотиков считали белки, консервативные у бактерий и отсутствующие в организме челове-

ка. При этом не учитывали особенности структурной организации этих белков, в том числе строение конкретных участков связывания потенциальных ингибиторов. Исключение из списка потенциальных мишеней белков патогенных микроорганизмов, гомологи которых есть у человека (в попытке избежать токсичности ингибитора), в целом следует признать малообоснованным. Важнейшие метаболические пути, как правило, консервативны, и ключевые ферменты этих путей содержатся как в патогенных бактериях, так и в организме человека. В качестве примера можно привести уже упоминавшийся противотуберкулезный препарат рифампицин, который ингибирует репликацию бактерий, селективно связываясь с β -субъединицей РНКП, гомолог которой есть и в организме человека [50].

Подводя итог, можно отметить общую тенденцию отказа от малоэффективных стохастических подходов в пользу более рациональных и фокусированных стратегий. В этом контексте роль методов биоинформатики и молекулярного моделирования в биотехнологии и биомедицине продолжает неуклонно возрастать. Разработка новых подходов к систематическому анализу различных центров связывания в больших суперсемействах белков должна помочь, с одной стороны, установить взаимосвязь между структурой, функцией и регуляцией белков/ферментов, и, с другой стороны, обнаружить участки связывания новых субстратов, а также ингибиторов/эффекторов с ранее неизвестным механизмом действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия, а также взаимодействие белков (ферментов) с различными низкомолекулярными соединениями являются важнейшими факторами регуляции их функциональных свойств. В настоящее время наиболее хорошо изучены молекулярные механизмы действия лигандов, связывающихся в функциональных сайтах белков (активных центрах ферментов), в то время как механизмы аллостерического ингибирования или связывания в других малоизвестных сайтах в структурах белков изучены недостаточно. В этом контексте большой интерес представляют не только взаимодействия между функциональным и аллостерическим центрами, но также поиск и характеристика новых сайтов связывания, их роль в функционировании белка. Несмотря на первые шаги в сторону большего понимания взаимосвязи структуры, функции и регуляции, этот вопрос еще далек от разрешения и требует дальнейшего изучения. Анализ опубликованных данных позволяет сделать вывод о том, что роль методов биоинформатики и молекулярного

моделирования в изучении роли различных участков связывания в функционировании белка, в том числе аллостерических эффектов, будет неуклонно расти. Установление эволюционных взаимосвязей между различными сайтами связывания в рамках суперсемейств белков, открытие новых функциональных, аллостерических и регуляторных сайтов с использованием вычислительных подходов должны улучшить наше понимание структурно-функциональных взаимосвязей в белках и предоставить новые возможности как для создания новых лекарственных средств, так и для дизайна более эффективных биокатализаторов. ●

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

Выравнивание белков суперсемейства РНКП

Структура бактериальной РНКП (код структуры в PDB: 1YNN) была использована в качестве заправки. Для реконструкции выборки эволюционно удаленных РНКП различных организмов (бактерий, животных, человека и т.д.) использовали поиск по структурному сходству в базе данных PDB с помощью алгоритма superpose пакета CCP4 [86]. При парном структурном сравнении допускалось не менее 30% совпадений элементов вторичной структуры в каждом белке. Для каждого обнаруженного удаленного гомолога реконструировали эволюционно близкие белки с использованием алгоритма BLAST и базы данных Swiss-Prot [87]. Получившиеся выборки фильтровали для удаления избыточных (повторя-

ющихся) последовательностей на уровне 95% парной идентичности, а также слишком непохожих белков со сходством менее 0.5 бит в колонке [88] по отношению к соответствующему гомологу с известной структурой. Структуры белков выравнивали с помощью алгоритма Matt [89], выравнивание последовательностей – с использованием программы T-coffee [90]. Полученное выравнивание удаленных гомологов использовали в качестве основы для выравнивания близких гомологов. Полученное структурно-опосредованное множественное выравнивание суперсемейства РНКП содержит 271 последовательность белков.

Поиск потенциальных сайтов связывания

Идентификацию карманов и полостей на поверхности структуры РНКП (код структуры в PDB: 1YNN), потенциально способных связывать низкомолекулярные лиганды, выполняли с помощью алгоритма Focket [35].

Биоинформатический анализ

Поиск СПП и специфических сайтов связывания в суперсемействе РНКП выполняли с использованием алгоритмов Zebra [91] и pocketZebra [39].

Структурный анализ

Визуализацию и анализ структурной информации о белках выполняли с использованием программы PyMol (Schrödinger LLC).

Доступ

Интерактивный доступ к результатам биоинформатического анализа суперсемейства ферментов ДНК-зависимых РНК-полимераз предоставлен через интернет-сервис <http://biokinet.belozersky.msu.ru/pocketzebra> (в разделе «Примеры»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Thornton J.M., Todd A.E., Milburn D., Borkakoti N., Orengo C.A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2000. V. 7. P. 991–994.
- Todd A.E., Orengo C.A., Thornton J.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 1999. V. 3. № 5. P. 548–556.
- Martin A.C., Orengo C.A., Hutchinson E.G., Jones S., Karmirantzou M., Laskowski R.A., Mitchell J., Taroni C., Thornton J.M. // Structure. 1998. V. 6. № 7. P. 875–884.
- Jones S., Thornton J.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2004. V. 8. № 1. P. 3–7.
- Laskowski R.A., Gerick F., Thornton J.M. // FEBS Lett. 2009. V. 583. № 11. P. 1692–1698.
- Goodey N.M., Benkovic S.J. // Nat. Chem. Biol. 2008. V. 4. № 8. P. 474–482.
- Hardy J.A., Wells J.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 6. P. 706–715.
- Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. // Proteins. 2004. V. 57. № 3. P. 433–443.
- Campbell E.A., Pavlova O., Zenkin N., Leon F., Irschik H., Jansen R., Severinov K., Darst S.A. // EMBO J. 2005. V. 24. № 4. P. 674–682.
- Esyunina D., Klimuk E., Severinov K., Kulbachinskiy A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 7. P. 2017–2022.
- Sousa R. // Cell. 2008. V. 135. № 2. P. 205–207.
- Darst S.A. // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. № 4. P. 159–162.
- Monod J., Changeux J.P., Jacob F. // J. Mol. Biol. 1963. V. 6. № 4. P. 306–329.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. № 1. P. 88–118.
- Perutz M.F., Rossmann M.G., Cullis A.F., Muirhead H., Will G. // Nature. 1960. V. 185. P. 416–422.
- Perutz M.F., Wilkinson A.J., Paoli M., Dodson G.G. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998. V. 27. № 1. P. 1–34.
- Eaton W.A., Henry E.R., Hofrichter J., Mozzarelli A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 1999. V. 6. № 4. P. 351–358.

18. Koshland D.E., Nemethy G., Filmer D. // *Biochemistry*. 1966. V. 5. № 1. P. 365–385.
19. Conway A., Koshland D.E. // *Biochemistry*. 1968. V. 7. № 11. P. 4011–4023.
20. Makshakova O.N., Semenyuk P.I., Kuravsky M.L., Ermakova E.A., Zuev Y.F., Muronetz V.I. // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 190. № 2. P. 224–235.
21. Eigen M. // *Nobel Symp.* 1967. V. 5. P. 333–369.
22. Arkin M.R., Wells J.A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. № 4. P. 301–317.
23. Schirmer T., Evans P.R. // *Nature*. 1990. V. 343. № 6254. P. 140–145.
24. Poorman R.A., Randolph A., Kemp R.G., Henrikson R.L. // *Nature*. 1984. V. 309. № 5967. P. 467–469.
25. Santamaría B., Estévez A.M., Martínez-Costa O.H., Aragón J.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 2. P. 1210–1216.
26. Ikeda Y., Taniguchi N., Noguchi T. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 13. P. 9150–9156.
27. Ikeda Y., Tanaka T., Noguchi T. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 33. P. 20495–20501.
28. Frauenfelder H., McMahon B.H., Austin R.H., Chu K., Groves J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 5. P. 2370–2374.
29. Hilser V.J., Thompson E.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 20. P. 8311–8315.
30. Chennubhotla C., Yang Z., Bahar I. // *Mol. Biosyst.* 2008. V. 4. № 4. P. 287–292.
31. Henrich S., Salo-Ahen O.M., Huang B., Rippmann F.F., Cruciani G., Wade R.C. // *J. Mol. Recognit.* 2010. V. 23. № 2. P. 209–219.
32. Weisel M., Proschak E., Schneider G. // *Chem. Cent J.* 2007. V. 1. № 7. P. 1–17.
33. Yu J., Zhou Y., Tanaka I., Yao M. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 1. P. 46–52.
34. Yaffe E., Fishelovitch D., Wolfson H.J., Halperin D., Nussinov R. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. Suppl 2. P. W210–W215.
35. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. № 1. P. 168.
36. Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F., Rarey M. // *J. Chem. Information Modeling*. 2012. V. 52. № 2. P. 360–372.
37. Laurie A.T.R., Jackson R.M. // *Bioinformatics*. 2005. V. 21. № 9. P. 1908–1916.
38. Hernandez M., Ghersi D., Sanchez R. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. Suppl 2. P. W413–W416.
39. Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhaviev V., Švedas V. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № W1. P. W344–W349.
40. Todd A.E., Orengo C.A., Thornton J.M. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 307. № 4. P. 1113–1143.
41. Huang B., Schroeder M. // *BMC Struct. Biol.* 2006. V. 6. № 1. P. 19.
42. Glaser F., Morris R.J., Najmanovich R.J., Laskowski R.A., Thornton J.M. // *Proteins*. 2006. V. 62. № 2. P. 479–488.
43. Kalinina O.V., Gelfand M.S., Russell R.B. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. № 1. P. 174.
44. Varfolomeev S.D., Gurevich K.G., Poroykov V.V., Sobolev B.N., Fomenko A.E. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2001. V. 379. № 1. P. 252–254.
45. Халудлин И.Г., Суплатов Д.А., Шалаева Д.Н., Оцука М., Асано Я., Швядас В.К. // *Acta Naturae*. 2010. T. 2. № 2. C. 70–74.
46. Суплатов Д.А., Аржаник В.К., Швядас В.К. // *Acta Naturae*. 2011. T. 3. № 1. C. 99–105.
47. Yang J.S., Seo S.W., Jang S., Jung G.Y., Kim S. // *PLoS Comput. Biol.* 2012. V. 8. № 7. P. e1002612–e1002612.
48. Kalinina O.V., Mironov A.A., Gelfand M.S., Rakhmaninova A.B. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 2. P. 443–456.
49. Suplatov D., Shalaeva D., Kirilin E., Arzhanik V., Švedas V. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. V. 32. № 1. P. 75–87.
50. Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. // *Cell*. 2001. V. 104. № 6. P. 901–912.
51. Porter C.T., Bartlett G.J., Thornton J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. Suppl 1. P. D129–D133.
52. Huang Z., Zhu L., Cao Y., Wu G., Liu X., Chen Y., Wang Q., Shi T., Zhao Y., Wang Y., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. Suppl 1. P. D663–D669.
53. Seifert A., Tatzel S., Schmid R.D., Pleiss J. // *Proteins*. 2006. V. 64. № 1. P. 147–155.
54. Suplatov D., Panin N., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudryavtsev P., Švedas V. // *PloS One*. 2014. V. 9. № 6. P. e100643.
55. Ichiye T., Karplus M. // *Proteins*. 1991. V. 11. № 3. P. 205–217.
56. Liu J., Nussinov R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 3. P. 901–906.
57. Dima R.I., Thirumalai D. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. № 2. P. 258–268.
58. Reynolds K.A., McLaughlin R.N., Ranganathan R. // *Cell*. 2011. V. 147. № 7. P. 1564–1575.
59. Ferguson A.D., Amezcua C.A., Halabi N.M., Chelliah Y., Rosen M.K., Ranganathan R., Deisenhofer J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 2. P. 513–518.
60. Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K. // *Nature*. 2012. V. 485. № 7397. P. 185–194.
61. Imming P., Sinning C., Meyer A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 10. P. 821–834.
62. Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 12. P. 993–996.
63. Arnold F.H. // *Acc. Chem. Res.* 1998. V. 31. № 3. P. 125–131.
64. Reetz M.T. // *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. / Third Ed. 2012. P. 119–190.
65. Reetz M.T., Carballeira J. D. // *Nat. Protocols*. 2007. V. 2. № 4. P. 891–903.
66. Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. № 8. P. 526–529.
67. Knowles J., Gromo G. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. № 1. P. 63–69.
68. Roses A.D., Burns D.K., Chissoe S., Middleton L., Jean P.S. // *Drug Discov. Today*. 2005. V. 10. № 3. P. 177–189.
69. Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007. V. 6. № 1. P. 29–40.
70. Chan P.F., Holmes D.J., Payne D.J. // *Drug Discov. Today: Therapeutic Strategies*. 2004. V. 1. № 4. P. 519–527.
71. Reetz M.T., Bocola M., Carballeira J.D., Zha D., Vogel A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 27. P. 4192–4196.
72. Нилов Д.К., Прохорова Е.А., Швядас В.К. // *Acta Naturae*. 2015. T. 7. № 2. C. 62–68.
73. Kuravsky M.L., Barinova K.V., Asryants R.A., Schmalhauzen E.V., Muronetz V.I. // *Biochimie*. 2015. V. 115. P. 28–34.
74. Pargellis C., Tong L., Churchill L., Cirillo P.F., Gilmore T., Graham A.G., Grob P.M., Hickey E.R., Moss N., Pav S., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2002. V. 9. № 4. P. 268–272.
75. Esnouf R., Ren J., Ross C., Jones Y., Stammers D., Stuart D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1995. V. 2. № 4. P. 303–308.
76. Conn P.J., Christopoulos A., Lindsley C.W. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. V. 8. № 1. P. 41–54.
77. Vázquez-Figueroa E., Chaparro-Riggers J., Bommarius A.S. // *ChemBioChem*. 2007. V. 8. № 18. P. 2295–2301.
78. Jochens H., Aerts D., Bornscheuer U.T. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2010. V. 23. № 12. P. 903–909.
79. Suplatov D.A., Besenmatter W., Švedas V.K., Svendsen A. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. V. 25. № 11. P. 689–697.
80. Pleiss J. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. № 5. P. 611–617.

81. Damborsky J., Brezovsky J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. V. 19. P. 8–16.
82. Suplatov D., Voevodin V., Švedas V. // *Biotechnology J.* 2015. V. 10. № 3. P. 344–355.
83. Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., et al. // *Nature*. 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
84. Galperin M.Y., Koonin E.V. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. № 6. P. 571–578.
85. Moir D.T., Shaw K.J., Hare R.S., Vovis G.F. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 3. P. 439–446.
86. Krissinel E., Henrick K. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004. V. 60. № 12. P. 2256–2268.
87. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
88. Fischer J.D., Mayer C.E., Söding J. // *Bioinformatics*. 2008. V. 24. № 5. P. 613–620.
89. Menke M., Berger B., Cowen L. // *PLoS Comput Biol.* 2008. V. 4. № 1. P. e10.
90. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. № 1. P. 205–217.
91. Suplatov D., Kirilin E., Takhaveev V., Švedas V. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. V. 32. № 11. P. 1752–1758.

УДК 576.5

Раковые стволовые клетки: пластичность против терапии

Т. В. Виноградова*, И. П. Чернов, Г. С. Монастырская, Л. Г. Кондратьева, Е. Д. Свердлов
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
*E-mail: vintv56@gmail.com
Поступила в редакцию 02.04.2015

РЕФЕРАТ Крупные успехи в идентификации и расшифровке механизмов регуляции взрослых стволовых клеток позволили предположить, что стволовые клетки могут функционировать и в опухолях, являясь центральными элементами их развития, начиная с начальной стадии и завершая метастазированием. Такие клетки получили название раковых стволовых клеток (РСК). В процессе интенсивной дискуссии гипотеза РСК постепенно стала восприниматься как очевидный факт. Действительно, недавно получено подтверждение существования РСК. Однако можно ли считать РСК универсальными пререквизитами опухоли и насколько существенна их роль в эволюции опухоли, остается проблемой, весьма далекой от решения. Далека от решения и проблема возможности использования РСК в качестве мишеней для терапии. В настоящем обзоре сделана попытка проанализировать проблему опухолевых стволовых клеток и перспективность терапии опухолей с использованием этих клеток в качестве мишеней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иерархическая структура опухоли, клональная эволюция, рак, раковые стволовые клетки, стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РСК – раковые стволовые клетки; SPM – stemness phenotype model.

ВВЕДЕНИЕ

Крупные успехи в идентификации и расшифровке механизмов регуляции взрослых стволовых клеток привели к предположению, что стволовые клетки могут функционировать и в опухолях, действуя как «двигатели» их развития, начиная с начальной стадии и завершая метастазированием. Такие клетки получили название раковых стволовых клеток (РСК). Важность проблемы вызвала появление многочисленных публикаций, посвященных этим гипотетическим центральным игрокам в развитии рака. Постепенно гипотеза стала восприниматься как факт, как некая «не обсуждаемая догма» [1]. И действительно, недавно в ряде работ было подтверждено существование РСК. Однако является ли роль РСК ключевой в эволюции опухоли и насколько их существование можно рассматривать как пререквизит эволюции злокачественной опухоли, остается проблемой, весьма далекой от решения. Далека от решения и возможность использования РСК в качестве мишеней для терапии опухолей.

В настоящем обзоре сделана попытка проанализировать проблему РСК и перспективность терапии опухолей с использованием этих клеток в качестве мишеней. Мы не будем затрагивать ряд весьма актуальных проблем, связанных с молекулярными механизмами регуляции онкогенеза. В стороне

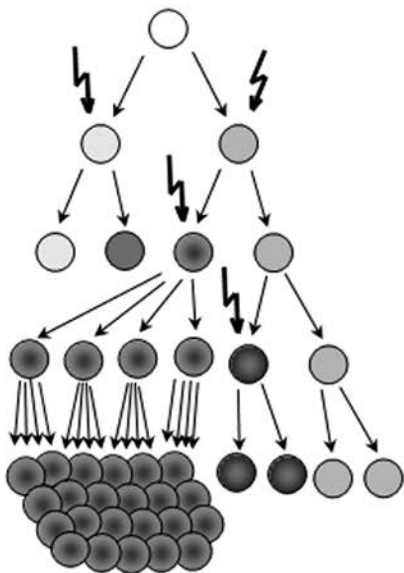
от обсуждения останется и весьма важная проблема устойчивости к терапевтическим воздействиям, которые читатель найдет в современных обзорах [2–11].

Большинство опухолей имеет моноклональное происхождение, но к моменту обнаружения состоит из генетически, эпигенетически и фенотипически гетерогенных клонов. Две основные концепции пытаются объяснить эту гетерогенность: гипотеза раковых стволовых клеток и модель клональной (стохастической) эволюции [12–19]. Хотя эти две концепции имеют некоторые общие положения, они принципиально различаются и диктуют разные подходы к терапии опухолей [12]. В последние годы разрабатываются теории, объединяющие эти две концепции [20, 21]. Значительную роль в этом объединении играют данные, получаемые в процессе массивного секвенирования геномов раковых клеток [22].

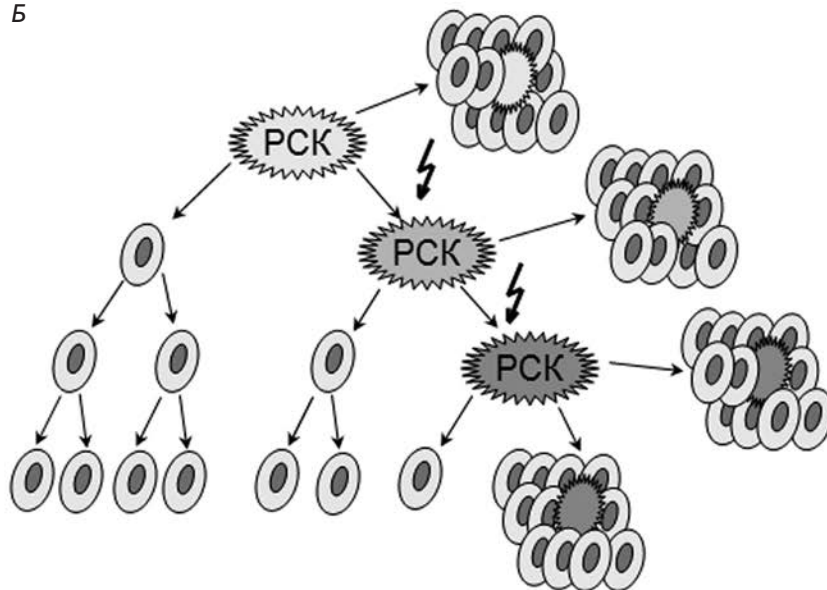
КЛАССИЧЕСКАЯ СТОХАСТИЧЕСКАЯ КЛОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ МОДЕЛЬ

Мы начнем с классической модели, рассматривающей эволюцию рака с точки зрения дарвиновской эволюции, в которой между собой конкурируют клетки, более или менее приспособленные к существованию в условиях опухоли [1, 12, 22–25]. Рассмотрим в соответствии с хронологией появления эволюцион-

А



Б



Модели, объясняющие происхождение гетерогенности злокачественных опухолей. А – модель клонально стохастической эволюции предполагает, что каждая опухолевая клетка обладает способностью инициировать образование опухоли. Прогрессия направляется редкими стохастическими событиями, происходящими во всех клетках. Клетки с мутациями, которые дают преимущество в росте, будут преобладать над остальными клетками опухоли и могут образовать новый клон, содержащий клетки различного фенотипа, имеющие различный пролиферативный потенциал. Показано, что некоторые из этих клеток имеют низкую способность к пролиферации (модифицировано из: <https://egtheory.wordpress.com/2014/10/25/stochastic-cancer>). Б – модель раковых стволовых клеток предполагает, что существует незначительная фракция опухолевых клеток, обладающих свойствами стволовых клеток и названных раковыми стволовыми клетками (PCK). Они определяют процессы образования, прогрессии и рецидивов опухоли. PCK способны к самообновлению и дифференцировке, способны к производству клеток всех типов, которые составляют массу опухоли. PCK имеют высокий пролиферативный потенциал и могут образовывать новые опухоли при трансплантации (модифицировано из: <http://www.hindawi.com/journals/jo/2008/492643/fig1>). Стохастические мутации показаны изломанными стрелками

ную стохастическую модель. Она схематически представлена на *рисунке А*.

Традиционно внутриопухолевую гетерогенность рассматривали на основании стохастической модели, предложенной Питером Ноувеллом (Peter Nowell) в 1976 году [26] (см., например, недавние обзоры [23, 27, 28]). Ноувелл опирался на накопившиеся к тому времени наблюдения о хромосомной гетерогенности в эволюционирующих опухолях. При этом в качестве центральной идеи он использовал понятие клона как группы клеток, происходящих от одной и той же клетки-прародительницы. Клональная связь между клетками возникает, когда в ходе селекции отбираются клетки, имеющие преимущества в приспособленности (например, скорость роста). Таким образом, предполагается, что генетические и эпигенетические изменения, возникающие при мутаци-

ях в клетках, могут селектироваться и давать клоны с разным количеством клеток. Поскольку в процессе эволюции опухоли отбирается много разных клонов, опухоль становится поликлональной, хотя все клетки и клоны происходят от одной исходной (*рисунк А*). Такая поликлональная структура подтверждена секвенированием геномов множества видов опухолей [28].

Эти клетки отличаются друг от друга генетически и эпигенетически, создавая громадную гетерогенность опухоли [29]. Они могут различаться и функционально с точки зрения дальнейшей эволюции: некоторые будут более агрессивными [30] и, в конечном счете, приведут к появлению метастазов. Важно, что мутации происходят стохастически – нет клеток и мест в геноме, где можно ожидать предпочтительное появление мутаций. Предполагалось, что рако-

вые клетки имеют мутаторный фенотип [9, 31, 32], что и определяет общее, неизбирательное увеличение скорости мутаций в «раковом» геноме по сравнению с нормальным.

Важно помнить, что все эти процессы происходят в определенном окружении, нише (которую можно назвать внутриорганизменной экосистемой [14]). Эта экосистема имеет большое влияние на селекцию клонов [33]. Она своя у каждого индивида, и это, по видимому, в значительной степени определяет непредсказуемо индивидуальную судьбу опухолевого процесса у каждого пациента.

Следует еще заметить, что каждая злокачественная опухоль характеризуется большим разнообразием мутаций, которые различаются у разных индивидов и способны по-разному направлять развитие опухоли и возникновение устойчивости к терапии [26]. Модели клональной эволюции и РСК не являются взаимоисключающими, так как эволюция РСК, скорее всего, также осуществляется по законам клональной эволюции [27].

Очень интересно предвидение, сделанное Ноувеллом еще в 1976 году в связи с индивидуальными различиями опухолей: «Каждую злокачественную опухоль следует рассматривать как индивидуальную терапевтическую проблему, после того как опухолевые клетки удалены насколько возможно с помощью неспецифических средств – хирургических, радио- и химиотерапевтических. Возможно, иммунотерапию можно будет рассматривать как основного наиболее легкого способа разрушения оставшейся опухоли».

Недавно появилась привлекающая внимание модель, в которой все клетки рассматриваются как фенотипически подобные стволовым (stemness phenotype model, SPM) – разновидность клональной стохастической модели [34]. Ввиду трудности перевода мы будем называть эту модель ее английским сокращением – SPM. Термин «stemness» [35, 36] включает в себя все свойства, приписываемые стволовым клеткам, в частности, способность к самообновлению и дифференцировке, и приобретает в последнее время популярность. Этот термин пытаются использовать применительно к РСК в более общем виде, подразумевающим способность поддерживать и регулировать состояние стволовой клетки [21]. SPM обладают в той или иной степени свойствами стволовых клеток – они способны вызывать развитие опухоли при имплантации, но и любая раковая клетка, в принципе, способна вызвать развитие опухоли. Таким образом, согласно этой модели, чтобы победить рак, все опухолевые клетки должны рассматриваться как мишени для уничтожения.

Предложены также другие модели, близко напоминающие SPM (для обзора см. [37]). Мы вернемся к этой модели при обсуждении проблем, связанных с РСК.

Следует отметить, что при применении любой модели необходимо учитывать, что опухоль – это сложная стохастическая динамическая структура с непредсказуемым поведением, или, иными словами, траекторией развития [38].

СУЩЕСТВУЮТ ЛИЛИ НЕТ РСК? ТРУДНОСТИ НАЧИНАЮТСЯ С ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В общем виде концепция РСК показана на *рисунке Б*. Прежде всего следует дать определение РСК и их отличительным свойствам. Проблемы, связанные с РСК, обсуждаются в недавних обзорах [6, 21, 35, 39–43], а также в других публикациях, цитируемых по ходу изложения.

Очевидность роли стволовых клеток в эмбриогенезе [39, 44–47] и гипотеза о том, что нормальная стволовая клетка может стать клеткой, где начинается процесс опухолевого перерождения [39, 48, 49], совершенно естественно были перенесены на опухоли и легли в основу концепции РСК [50, 51]. Проблеме РСК посвящено громадное количество статей. Иногда РСК называют опухоль-иницирующими клетками (tumor-initiating cells, TIC) или опухоль-генерирующими клетками (tumor-propagating cells, TPC) [1, 43]. Мы будем использовать термин РСК.

Постепенно и термин, и реальное существование РСК стали восприниматься как само собой разумеющееся, иногда даже как «не подлежащая дискуссии догма» [1]. Тем не менее существование РСК и определение критериев, позволяющих отличить РСК от других раковых клеток, остаются нерешенными и серьезно дебатированными вопросами.

Концепция раковых стволовых клеток появилась в середине 1990 года (для обзора см. [21, 52–56]) и с тех пор стала объектом интенсивных дискуссий и уточнений – как по сути дела, так, что весьма существенно, и в области номенклатуры. В основу этой концепции положен сценарий, по которому движется нормальная стволовая клетка в процессе дифференцировки. Исходно считали, что мутации, ведущие к раку, происходят в нормальной стволовой клетке, и в результате она превращается в раковую стволовую клетку. Способность нормальной стволовой клетки к самообновлению и дифференцировке автоматически приписали и предполагаемой раковой стволовой клетке. В таком случае РСК должна постоянно давать новые клетки: раковую стволовую и более дифференцированное потомство, способное только к ограниченному числу делений. В процессе делений РСК накапливает мутации. Более дифференцированные клетки только ограниченно мутиру-

ют, и их геном отражает состояние раковой стволовой клетки, от которой они произошли. Образуются клоны. И хотя в основном считается, что раковая клетка происходит из нормальной стволовой клетки, в процессе развития опухоли РСК могут образовываться из разных клеток опухоли, в том числе и дифференцированных за счет дедифференцировки (см. ниже).

В 2011 году состоялась рабочая конференция по раковым стволовым клеткам (Working Conference on CSCs), которая выработала основные рекомендации по определениям, сформулированным в обзоре [43]. Согласно этим рекомендациям, под РСК подразумеваются неопластические клетки, способные в течение неограниченного или продолжительного периода времени размножить или поддерживать инвазивную солидную опухоль или лейкоз.

По-видимому, это определение стало плодом трудных усилий по выработке консенсуса, поскольку существует и используется много других определений, которые учитывают, например, такое важное свойство, как самообновление.

Мы приведем несколько определений из последних обзоров, опубликованных в наиболее престижных журналах:

1. Nature Review Cancer, 2012 г. [57]: «Мы определяем РСК как клетки, содержащиеся внутри опухоли, которые могут генерировать раковые клетки. Это определение предполагает, что не все клетки внутри злокачественной популяции обладают этими свойствами... Определение также имеет в виду, что РСК ответственны за генерацию всех клеток внутри популяции, которые теряют способность генерировать новые опухолевые клетки... Оно также предполагает выбор альтернативных путей существования (продолжать генерировать новые клетки или утратить эту способность). Это свойство вписано в установившуюся внутриклеточную сеть молекулярных откликов [на сигналы], связанную с той тканью, от которой происходят РСК. Потеря способности генерировать новые клетки трудно обратима *in vivo*».

2. Cell Cycle, 2013 г. [58]: «Концепция РСК утверждает, что как и в нормальных соматических клетках небольшая популяция РСК до бесконечности воспроизводится и генерирует очень гетерогенную популяцию организованных в клоны клеток с ограниченной продолжительностью жизни (так называемых производных популяций клеток)».

3. Cell Stem Cell, 2012 г. [42]: «Модель РСК постулирует иерархическую организацию клеток опухоли, в которой только небольшая доля клеток ответственна за поддержание онкогенеза и создает гетерогенность клеток, свойственную первичной опухоли... РСК проявляют свойства стволовых клеток – самообновление и дифференциацию».

4. Nature Review Drug Discovery, 2014 г. [6]: «Гипотеза РСК предполагает существование неопластических клеток внутри опухоли, которые обладают повышенной способностью индуцировать новую опухоль при имплантации экспериментальным животным. Предполагается, что такие клетки способны к асимметричному делению, давая дочернюю клетку, которая остается РСК (самообновление), и другую дочернюю [дифференцированную] клетку, которая входит в неопластические клетки, образующие массу опухоли... Существование множества субпопуляций с различными иницирующими опухоль свойствами теперь вне сомнений. Сейчас лучше использовать термин "парадигма РСК"... До сегодняшнего дня не установлена способность большинства РСК дифференцироваться более чем в один тип не-РСК-клеток, образующих массу опухоли... Фенотип РСК сложен. Он варьирует от одной опухоли к другой, поэтому его часто трудно однозначно ассоциировать с какими-либо признаками, за исключением функциональной способности иницировать опухоль у экспериментальных животных. Более того, существование РСК в опухоли означает, что при общем генетическом строении могут существовать два альтернативных фенотипа: РСК и не-РСК».

5. Cell Stem Cell, 2014 г. [21]: «Во многих видах рака РСК представляют отдельную популяцию, которая может быть отделена от остальной массы клеток. Они могут проявлять способность к формированию опухоли при имплантации и к самообновлению, определяющему свойству РСК. Тем не менее в некоторых видах рака невозможно отличить РСК от не-РСК, потому что большинство клеток обладают функциями РСК. Такие опухоли кажутся гомогенными или имеют очень неглубокую иерархию».

Требования самообновления и долговременной способности генерировать раковые, более дифференцированные клетки, сформулированы уже в 2015 году [59].

Следует особо подчеркнуть, что РСК, если следовать концепции РСК, образуют в опухоли *отдельную* популяцию, которая отличается от основной массы опухоли способностью к формированию новой опухоли при имплантации, самообновлению и присутствием фенотипических маркеров, позволяющих отделять их от основной массы. В целом, концепция РСК представляет собой иерархическую модель с РСК во главе, потому модель РСК иногда называют иерархической. Она совершенно подобна иерархии, наблюдаемой у взрослых стволовых клеток, которые при дифференцировке дают цепочку все более дифференцированных клеток.

Таким образом, согласно концепции популяция РСК:

1. Составляет незначительную долю общей популяции клеток опухоли.
 2. Экспрессирует специфический набор поверхностных маркеров, которые позволяют дифференцировать ее и выделять из массы других клеток.
 3. Селективно поддерживает способность к онкогенезу, в отличие от других популяций опухолевых клеток.
 4. Поддерживает рост гетерогенной массы, содержащей полный репертуар частично (или полностью) дифференцированных раковых клеток, способных к нескольким дифференцировкам или находящимся на стадии окончательной дифференцировки.
 5. Образует отдельный пул клеток, идентифицируемый биологическими и физико-химическими методами. (Должны существовать по меньшей мере два пула клеток в опухоли: РСК и их производные – дифференцированные в разной степени клетки [1].)
 6. Проявляет способность, подобно нормальным стволовым клеткам, к неограниченному самообновлению и дифференцировке по многим направлениям [37].
 7. Проявляет высокую устойчивость к стандартной терапии. Возможные причины повышенной устойчивости предполагаемых РСК детально изложены в недавних обзорах [37, 60]. В их число входят селективная экспрессия некоторых членов семейства транспортеров множественной лекарственной устойчивости, повышенная экспрессия антиапоптотических молекул, повышенная способность к репарации ДНК, активация характерных для стволовых клеток сигналов выживания (prosurvival signaling), в частности, Notch, Hedgehog (Hh), Wnt, JAK/STAT и др. Однако полная определенность в этом вопросе отсутствует, и нужны дополнительные исследования, в первую очередь, предполагающие точное понимание того, что выявляемые эффекты относятся к РСК.
- Важно понимать, что РСК (как и раковые клетки вообще) характеризуются повышенной внутрипу-

холовой гетерогенностью. Они образуют в опухоли субклоны, внутри которых, тем не менее, каждая клетка отличается от другой по структуре генома, характеру транскриптома, протеома и т.п. Эта гетерогенность приводит к различным и постоянно меняющимся по мере развития опухоли комбинациям молекулярных дефектов в субклонах. Субклоны имеют разные злокачественные потенциалы, поскольку РСК, движущие их размножение, различаются, могут также оказываться в разном внутриопухолевом микроокружении и по-разному взаимодействовать с этим микроокружением.

Из этого следует, что каждый существующий и размножающийся субклон должен содержать свой компартмент РСК, обладающих уникальными геномными и эпигеномными характеристиками, и каждый субклон может давать новые субклоны, свойства которых будут изменены по сравнению с исходным субклоном. Если в новом субклоне образуется новая клетка, обладающая повышенным злокачественным потенциалом, то она будет представлять собой новую РСК и сможет генерировать новые РСК.

Экспериментально существование РСК человека подтверждается способностью клеток, полученных непосредственно от пациента, продуцировать злокачественную дочернюю популяцию при трансплантации мыши с иммунодефицитом. Критерием того, что эти РСК действительно отличаются от основной массы опухолевых клеток, служит присущее им какое-либо фенотипическое отличие, позволяющее физически отделять их от основной массы, например, поверхностный антиген.

Идентификации поверхностных антигенов, характерных для РСК, посвящено большое число экспериментальных работ и обзоров, и список таких маркеров постоянно растет. В *табл. 1* перечислены некоторые маркеры и внутриклеточные белки, характерные для предполагаемых РСК, о которых речь пойдет дальше.

Таблица 1. Характерные поверхностные антигены, встречающиеся с повышенной частотой в предполагаемых РСК, и направленные против них препараты, использованные в клинических испытаниях [59] (см. также [105])

Поверхностный антиген	Вид рака, содержащий данный антиген в РСК	Используемый препарат
CD20	ALL, CLL	Rituximab
CD33	CML, AML	GO
CD44	AML	mAb
CD52	5q-AML, CLL	Alemtuzumab
CD123	AML	mAb
EGFR	Colon-Ca	Cetuximab
HER2/neu	Breast/Gastric/Ovarian-Ca	Trastuzumab

Примечание. ALL – острый лимфобластный лейкоз; CLL – хронический лимфобластный лейкоз; CML – хронический миелоидный лейкоз; AML – острый миелоидный лейкоз; mAb – моноклональные антитела; Ca – карцинома.

Методом проточной цитофлуориметрии, используя характерные поверхностные маркеры, потенциальные РСК можно отделить от основной массы опухолевых клеток [61, 62]. Отобранные клетки обладают более высокой туморогенностью при ксенотрансплантации иммунокомпетентным животным. Существенная биохимическая характеристика таких клеток – повышенная экспрессия таких цитопротективных ферментов, как альдегиддегидрогеназа (aldehyde dehydrogenase, ALDH), и насосов, выкачивающих из клетки токсичные вещества, например, ABC-транспортеров [61, 62].

Это маркирование не стопроцентное, возможны РСК без маркеров и не-РСК с маркерами [35, 63]. Таким образом, маркеры не относятся к стабильным фенотипическим признакам, они могут варьировать от индивида к индивиду и меняться на разных стадиях развития опухоли. Поэтому сами по себе фенотипические данные не могут служить достаточным доказательством присутствия отдельной популяции РСК. Предполагается, что механизмы, определяющие особые свойства РСК, нестабильны, поскольку могут быть связаны с изменениями эпигенома, частыми в опухолевых популяциях [43]. Есть и другие основания полагать, что фенотип РСК может быть весьма нестабильным [43].

Некоторые упоминавшиеся характеристики РСК, в частности асимметричное деление и необратимый процесс перехода в дифференцированное состояние, не доказаны и кажутся маловероятными [1], а необратимость перехода опровергнута недавними экспериментами (см. ниже). К утверждению, что РСК составляют относительно небольшую фракцию в общей популяции клеток, также следует относиться с осторожностью, поскольку фракция РСК может сильно варьировать (от 0.1 до 30%) в зависимости от типа опухоли и дизайна эксперимента [27, 64–66].

По-видимому, правы авторы обзора [27], полагающие, что некоторые виды рака развиваются посредством РСК, тогда как другие – нет. Высказывается предположение, что это может относиться даже к одному и тому же виду рака, но у разных пациентов.

Если концепция РСК верна, то с практической точки зрения это означает, что все измерения, которые мы делаем, в частности, полногеномное секвенирование, должны относиться к общей массе опухоли, которая уже прекратила активное деление и накопление мутаций. А РСК, которых абсолютное меньшинство и которые после отделения основной массы продолжают активно делиться и приобретать мутации, придающие им новые функциональные потенциалы, остаются в этой массе за скобками. Если все-таки изучение общей массы дает позитивный эффект, то благодаря тому, что все клетки этой мас-

сы происходят от РСК и содержат общие с ними генетические элементы. Однако многие элементы РСК, которые могут оказаться существенными с диагностической и прогностической точек зрения, могут ускользать от внимания исследователей. Особенно это касается эпигенетических изменений. Можно предвидеть, что гетерогенность внутри фракции РСК должна быть выше, чем в основной массе, состоящей по большей части из дифференцированных и неделящихся опухолевых клеток. Недавний анализ экзомов [67] показал, что большинство соматических мутаций во фракции РСК и в основной массе опухоли совпадают. Эти данные могут трактоваться как результат постоянных динамических переходов от РСК к дифференцированному состоянию, и наоборот. Об этом речь пойдет ниже.

Многие аспекты модели РСК остаются дискуссионными, но несколько экспериментов, использующих современные технологии отслеживания траектории клеток в процессе развития, в том числе развития опухоли (lineage-tracing studies), дают серьезные аргументы в пользу более или менее стабильного существования РСК и иерархической организации опухоли, по крайней мере, в некоторых случаях. Такие эксперименты проведены на мышечных моделях опухолей головного мозга [68], тонкого кишечника [69], кожи [70], колоректальной аденомы человека [71] и глиомы [72] (см. также комментарий [73]). В этих работах показано, что большинство клеток исследованных опухолей имеют ограниченный пролиферативный потенциал и, по-видимому, происходят от субпопуляций со свойствами, похожими на РСК.

НИША РСК – ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ

Признано, что у нормальных стволовых клеток существуют так называемые ниши – физиологическое микроокружение, состоящее из специализированных клеток, которые участвуют в регуляции функционирования стволовых клеток через обмен различного рода сигналами. В этом случае определение ниши, в которой они существуют, не вызывает принципиальных проблем [44, 45, 74–77]. Это достаточно четко определенная область, окружающая дискретно локализованные функционирующие стволовые клетки в ткани, хотя не для всех нормальных тканей доказано существование стволовых клеток и соответственно их ниш [39]. По классическому определению: «Популяции стволовых клеток образуются в нишах – особых анатомических компартментах, которые регулируют участие этих клеток в образовании, поддержании и репарации ткани. Ниша предотвращает истощение стволовых клеток, одновременно защищая организм хозяина от их избыточной

пролиферации. Ниша является базисной единицей физиологии ткани» [78].

По аналогии со взрослыми стволовыми клетками предположили, что ниши существуют также у РСК, и взаимодействие РСК с нишами может регулировать самообновление, пролиферацию и дифференцировку РСК [77, 79, 80]. Однако в случае РСК возникает больше вопросов, чем ответов (см. недавние обзоры [1, 81, 82]). Многие авторы (например, [79]) рассматривают солидную опухоль как «орган», состоящий из раковых клеток и стромы, которая занимает большую часть объема опухоли и создает микроокружение, которое может считаться аналогом ниши нормальных клеток.

Ниша РСК – это микроокружение, не сформированное в морфологическую структуру [83]. Однако, по мнению ряда авторов (см., например, обзор [84]), ниши РСК все же отличаются от общего микроокружения. Клетки внутри ниши продуцируют факторы, которые стимулируют самообновление РСК, индуцируют ангиогенез, рекрутируют иммунные и другие стромальные клетки, секретирующие дополнительные факторы, способствующие инвазии и метастазированию раковых клеток.

Взаимодействию стромальных элементов опухоли с предполагаемыми РСК посвящено большое число статей. Есть, например, данные, что противоопухолевые средства по разному действуют на гипотетические РСК *in vitro* и *in vivo* [43], а это может означать, что в микроокружении (нише) содержатся некоторые важные компоненты регуляции РСК. Микроокружение включает в себя внеклеточный матрикс, мезенхимальные и эндотелиальные клетки, клетки иммунной системы, молекулы адгезии, разнообразные факторы роста, цитокины и их рецепторы [57, 85]. Предполагается, что кровеносные сосуды также могут участвовать в создании ниши [81], как они это делают в случае нормальных стволовых клеток. Опухолевая строма секретирует факторы, которые регулируют поведение раковых клеток [80], активно поддерживает рост опухоли за счет нео- и ангиогенеза [86]. Микроокружение определяет судьбу опухоли, служит барьером для терапевтических воздействий и может влиять на пластичность опухолевых клеток, например, на переходы от РСК к не-РСК [8].

Широко обсуждаются двусторонние взаимодействия между раковыми клетками и стромой, особенно роль стромы в развитии опухоли и, в частности, в приобретении таких важнейших качеств, как способность к инвазии и метастазированию [87]. Предполагается, что не только стромальная ниша действует на раковые клетки, но и наоборот: раковые клетки (в основном имеются в виду РСК) способны

влиять на строму, используя ее для своего развития [81], в частности, для создания преметастатической ниши в местах метастазирования [80, 85, 86, 88].

Несмотря на широко обсуждаемую важность стромальной ниши в жизни опухоли, только очень немногие данные надежно подтверждают ее функции на молекулярном уровне, а также на уровне транспорта информации, например, осуществляется ли этот транспорт паракринно, аутокринно или каким-либо иным способом [43].

Более детальная информация по этому поводу поможет лучше оценить реальную роль ниши в развитии опухолей и выработать рациональные терапевтические стратегии.

НОРМАЛЬНЫЕ И РАКОВЫЕ НЕСТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МОГУТ СПОНТАННО ПРЕВРАЩАТЬСЯ В СОСТОЯНИЕ, ПОДОБНОЕ СТВОЛОВЫМ. ПО-ВИДИМОМУ, НЕ СУЩЕСТВУЕТ ЖЕСТКОГО БАРЬЕРА МЕЖДУ РСК И НЕ-РСК-КЛЕТКАМИ РАКА

Разные виды рака и, возможно, даже один и тот же вид у разных пациентов могут развиваться и по модели РСК, и по эволюционно стохастической модели. Имея дело с такими лабильными системами, как стволовые, раковые или РСК-клетки, всегда нужно учитывать возможность их фенотипической перестройки вследствие эпигенетических процессов. В 2011 году три группы [89, 90] (см. для обзора [35, 91]), используя раковые клеточные линии и первичные опухоли, описали приобретение способности к самообновлению у не-РСК-популяций. Так, описаны эпителиальные клетки молочной железы, способные спонтанно дедифференцироваться в «стволовоподобное» состояние [92]. Опухолевая трансформация усиливала эту способность так, что обычные раковые клетки переходили в состояние, подобное РСК, *in vitro* и *in vivo*. Эти данные показали высокую пластичность стволовых клеток вообще и РСК в особенности, а также легкость взаимопревращений стволовых клеток в нестволовые и наоборот, особенно в злокачественных опухолях.

Все это дает основание полагать, что подобная обратимость и отсутствие жесткой иерархии стволовых и нестволовых клеток могут быть обычным явлением, делая терапию рака еще более проблематичной, в частности, терапию, направленную на РСК.

Выявляемая пластичность раковых клеток и возможность перехода между стволовыми и нестволовыми клетками вносит дополнительные сложности в изучение роли раковых стволовых клеток в канцерогенезе. Эта пластичность может зависеть от многих факторов, среди которых важную роль играют сигналы от микроокружения и межклеточные взаимодействия в нише [8]. Переходы, скорее всего, пред-

ставляют собой стохастические эпигенетические или генетические события, на которые влияет микроокружение раковых клеток и межклеточные взаимодействия в нише [20]. Так, РСК могут превращаться в не-РСК и наоборот [8], существуя в динамическом равновесии [93].

Один из существенных элементов концепции РСК – присутствие в опухолевой массе необратимо отделенной фракции РСК (см. выше), оказывается в общем виде несостоятельным [88, 91]. Дифференцированные раковые клетки и РСК находятся в состоянии постоянного взаимопревращения [94]. Факторы окружающей среды, в частности факторы роста, могут вызывать переходы между ними. Более того, пластичность РСК может приводить к переходу эпителиальных раковых клеток в мезенхимальные (и обратно) [6, 41, 67, 95–98]. Эта фенотипическая пластичность обусловлена как эпителиально-мезенхимальными и мезенхимально-эпителиальными переходами, так и, по-видимому, действием генетических, эпигенетических и сигнальных внутриклеточных и межклеточных программ [58]. Можно предположить, что существование и пластичность РСК зависят как от внутренних факторов (генетической и эпигенетической архитектуры раковых клеток), так и от микроокружения. Поскольку и те и другие факторы весьма специфичны как в отношении типа опухоли, так и индивидуальных особенностей пациента, легко представить ситуацию, когда в одних случаях РСК присутствуют, и барьер между РСК и не-РСК достаточно высок, чтобы обеспечивать отдельную фиксированную фракцию РСК, тогда как в других этот барьер низок и допускает постоянные взаимопревращения РСК и не-РСК-клеток. Наконец, в одних видах рака и у групп больных РСК не образуются, и эволюция опухоли протекает по клонально стохастическому механизму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. РСК КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

Возможному использованию РСК в терапевтических целях посвящены многочисленные публикации. Это не удивительно.

Большая часть опухолевой массы имеет ограниченную пролиферативную способность, тогда как РСК, если они действительно являются движущей силой развития опухоли, представляют собой лишь небольшую ее часть. В результате терапевтические агенты действуют в основном на более дифференцированные части опухоли, и их эффективность невысока. Воздействие, направленное на активное меньшинство РСК, могло бы сильно увеличить эффективность терапии. В результате, как полагают многие авторы (см., например [59]), РСК в последние годы рассматривали (и продолжают рассматривать)

в качестве весьма перспективной мишени терапевтического воздействия. Весьма интенсивно разрабатываются новые стратегии и подходы к терапии, ориентированной на РСК. Литература, посвященная принципам и методам, разрабатываемым в этой области, весьма обильна и противоречива. Читатели могут ознакомиться с идеями и предлагаемыми методами в ряде обзоров, опубликованных в 2015 году [8, 59, 99–105]. Признаки РСК, которые пытались использовать для терапевтического воздействия, приведены в *табл. 1*.

Несмотря на все разнообразие предлагаемых подходов, можно выделить две основные стратегии, отличающиеся выбором мишени (см. [35] и обзоры, цитированные выше). В первой разнообразные воздействия нацелены на поверхностные антигены, предположительно характерные для РСК. Во второй стратегии используют то обстоятельство, что предполагаемые РСК, будучи самообновляющимися клетками, во многом похожими на эмбриональные стволовые клетки (см., например [35, 59]), должны экспрессировать эмбриональные сигнальные системы (pathways), не характерные для взрослых клеток [59].

Что касается поверхностных антигенов, то в известных случаях РСК и нормальные клетки, а также нормальные стволовые клетки содержат такие же антигены. В результате терапия, направленная против поверхностных антигенов, часто вызывает сильные побочные эффекты. Например, терапевтические моноклональные антитела гемтузамаб озогамидин (gemtuzumab ozogamicin, GO, анти-CD33) и алемтузамаб (alemtuzumab, анти-CD52) были недавно удалены с онкологического рынка ввиду их токсичности, поэтому продолжаются поиски поверхностных маркеров РСК, обладающих более высокой селективностью [59].

В качестве мишеней для воздействия на РСК исследованы также компоненты различных сигнальных путей, известных своим участием в эмбриогенезе, таких, как Notch, Hedgehog (НН) и Wnt. Некоторые из них приведены в *табл. 1* (см. [59, 99] и другие цитированные обзоры). Сейчас еще рано судить об успешности той или иной терапии, поскольку испытания находятся на ранних стадиях (*табл. 2*). Однако следует отметить, что терапия, направленная на эмбриональные сигнальные системы, активные во взрослых стволовых клетках, может приводить к появлению серьезных побочных эффектов.

В начале 2015 года в журнале Science была опубликована статья [102], в которой приведены разные точки зрения на проблему существования раковых стволовых клеток и их значимости для эволюции и терапии рака. Приведены, в частности, как прак-

Таблица 2. Сигнальные пути, использованные в клинических испытаниях для ингибирования различных видов рака (модифицировано из [105])

Тип рака	Сигнальный путь-мишень	Терапия: моно- или комбинированная
Рак толстой кишки	STAT/ β - β -катенин/Nanog	Комбинированная
Рак желудка	STAT/ β - β -катенин/Nanog	Монотерапия комбинированная
Гастроинтестинальный рак	STAT/ β - β -катенин/Nanog	Комбинированная
Гепатоцеллюлярная карцинома	STAT/ β - β -катенин/Nanog Wnt/FZD8Fc/FAK	Комбинированная Комбинированная
Мезотелиома	FAK	Монотерапия
Плоскоклеточный рак легкого	Notch FAK	Комбинированная монотерапия
Рак яичка	Notch FAK	Комбинированная Комбинированная
Рак поджелудочной железы	STAT/ β - β -катенин/Nanog Notch	Комбинированная Комбинированная
Мелкоклеточный рак легкого	Notch	Комбинированная

тические, так и теоретические соображения о реальности использования раковых стволовых клеток в качестве единственной терапевтической мишени.

В нашем обзоре мы попытались рассмотреть эти проблемы с различных точек зрения. Мы считаем, что приведенные данные позволяют высказать сомнения в том, что терапия, направленная на РСК, будет иметь успех. Так полагают, что возможность легкого перехода из РСК в недифференцированные клетки и наоборот не позволит до конца уничтожать РСК. Более того, высказываются опасения в высокой вероятности возникновения клеток, инициирующих появление новой опухоли из оставшихся недифференцированных раковых клеток. Клинические испытания веществ, направленных против РСК, находятся на слишком ранних стадиях, чтобы судить об успехе. Как пишет Kaiser J. [102], заканчивая свою статью: «Сейчас пациенты и инвесторы компании, ориентированные на РСК как на мишени, и врачи с нетерпением ждут результатов клинических испытаний. Эти результаты могут дать надежду тем, кто сделал ставку на этот вид терапии. Однако они не станут решением проблемы для исследователей, которые сомневаются в реальности РСК. Говорит Джереми Рич (Jeremy Rich) из Кливлендской клиники в Огайо: "Даже если мы будем дико успешны, во что я не верю, не думаю,

что мы получим однозначный ответ [Относительно существования РСК]"».

В 1209 году папский легат, активный участник Альбигойского Крестового похода, Арнольд Амальрик при осаде крепости Безье, где оборонялись истинные католики и еретики, якобы так ответил на вопрос, как отличить правоверных от еретиков: «Убивайте всех, Господь распознает своих!» Это неприменимо к людям, но это единственная, на наш взгляд, правильная стратегия терапии рака – не надо искать различий между раковыми клетками, убивайте их все. Мы в своей работе придерживаемся именно этого принципа, сочетая в генно-терапевтической стратегии два способа тотального убийства раковых клеток – суицидальную генную терапию (suicide gene therapy) и иммунотерапию. По крайней мере, в доклинических испытаниях это дает весьма положительный эффект [106].

Анализ клинических испытаний [105], примеры которых приведены в табл. 2, показывает, что большинство исследователей также используют комбинированную терапию, что абсолютно правильно, учитывая чрезвычайную пластичность РСК. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-50-00131).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maenhaut C., Dumont J.E., Roger P.P., van Staveren W.C. // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. № 2. P. 149–158.
2. Moitra K., Lou H., Dean M. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011. V. 89. № 4. P. 491–502.
3. Cunningham J.J., Gatenby R.A., Brown J.S. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 8. № 6. P. 2094–2100.

4. Rycaj K., Tang D.G. // *Int. J. Radiat. Biol.* 2014. V. 90. № 8. P. 615–621.
5. Dean M. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2009. V. 14. № 1. P. 3–9.
6. Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014. V. 13. № 7. P. 497–512.
7. Colak S., Medema J.P. // *FEBS J.* 2014. V. 281. № 21. P. 4779–4791.

8. Cabrera M.C., Hollingsworth R.E., Hurt E.M. // *W. J. Stem Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 27–36.
9. Roberts S.A., Gordenin D.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2014. V. 14. № 12. P. 786–800.
10. Du W., Elemento O. // *Oncogene*. 2015. V. 34. P. 3215–3225.
11. Tam W.L., Weinberg R.A. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 11. P. 1438–1449.
12. Campbell L.L., Polyak K. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 19. P. 2332–2338.
13. Ding L., Ellis M.J., Li S., Larson D.E., Chen K., Wallis J.W., Harris C.C., McLellan M.D., Fulton R.S., Fulton L.L., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7291. P. 999–1005.
14. Greaves M., Maley C.C. // *Nature*. 2012. V. 481. № 7381. P. 306–313.
15. Marusyk A., Polyak K. // *Science*. 2013. V. 339. № 6119. P. 528–529.
16. Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., McIndoo J., Cook K., Stepansky A., Levy D., Esposito D., et al. // *Nature*. 2011. V. 472. № 7341. P. 90–94.
17. Yates L.R., Campbell P.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 11. P. 795–806.
18. Collisson E.A., Cho R.J., Gray J.W. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012. V. 9. № 11. P. 621–630.
19. Swanton C., Burrell R.A., Futreal P.A. // *Breast Cancer Res.* 2011. V. 13. № 1. P. 104.
20. Shah M., Allegrucci C. // *Breast Cancer (Dove Med. Press)*. 2012. V. 4. P. 155–166.
21. Kreso A., Dick J.E. // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 3. P. 275–291.
22. Ma Q.C., Ennis C.A., Aparicio S. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. № 1. P. 3–9.
23. Merlo L.M., Pepper J.W., Reid B.J., Maley C.C. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 12. P. 924–935.
24. Brosnan J.A., Iacobuzio-Donahue C.A. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012. V. 23. № 2. P. 237–242.
25. Sabaawy H.E. // *J. Leukemai (Los Angel)*. 2013. V. 1. № 4. P. 1000124.
26. Nowell P.C. // *Science*. 1976. V. 194. № 4260. P. 23–28.
27. Shackleton M., Quintana E., Fearon E.R., Morrison S.J. // *Cell*. 2009. V. 138. № 5. P. 822–829.
28. Aparicio S., Caldas C. // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. № 9. P. 842–851.
29. Sverdlov E.D. // *Curr. Gene Ther.* 2011. V. 11. № 6. P. 501–531.
30. Podlaha O., Riemer M., De S., Michor F. // *Trends Genet.* 2012. V. 28. № 4. P. 155–163.
31. Loeb L.A., Bielas J.H., Beckman R.A. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 10. P. 3551–3557; discussion 3557.
32. Prindle M.J., Fox E.J., Loeb L.A. // *Curr. Drug Targets*. 2010. V. 11. № 10. P. 1296–1303.
33. Polyak K., Haviv I., Campbell I.G. // *Trends Genet.* 2009. V. 25. № 1. P. 30–38.
34. Cruz M.H., Siden A., Calaf G.M., Delwar Z.M., Yakisich J.S. // *ISRN Oncol.* 2012. V. 2012. P. 392647.
35. O'Connor M.L., Xiang D., Shigdar S., Macdonald J., Li Y., Wang T., Pu C., Wang Z., Qiao L., Duan W. // *Cancer Lett.* 2014. V. 344. № 2. P. 180–187.
36. Snippert H.J., Clevers H. // *EMBO Rep.* 2011. V. 12. № 2. P. 113–122.
37. Luo J., Zhou X., Yakisich J.S. // *Onco Targets Ther.* 2014. V. 7. P. 1129–1134.
38. Свєрдлов Е. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014. V. 100. № 5. P. 505–541.
39. White A.C., Lowry W.E. // *Trends Cell Biol.* 2015. V. 25. № 1. P. 11–20.
40. Allegra A., Alonci A., Penna G., Innao V., Gerace D., Rotondo F., Musolino C. // *Cancer Invest.* 2014. V. 32. № 9. P. 470–495.
41. van de Stolpe A. // *Am. J. Cancer Res.* 2013. V. 3. № 1. P. 107–116.
42. Visvader J.E., Lindeman G.J. // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 10. № 6. P. 717–728.
43. Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J.V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J.J., Stassi G., et al. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 11. P. 767–775.
44. Rompolas P., Mesa K.R., Greco V. // *Nature*. 2013. V. 502. № 7472. P. 513–518.
45. O'Brien L.E., Bilder D. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. V. 29. P. 107–136.
46. Fuchs E. // *Cell*. 2009. V. 137. № 5. P. 811–819.
47. Alison M.R., Islam S. // *J. Pathol.* 2009. V. 217. № 2. P. 144–160.
48. Shibata M., Shen M.M. // *BioEssays*. 2013. V. 35. № 3. P. 253–260.
49. Blanpain C. // *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. № 2. P. 126–134.
50. Shackleton M. // *Semin. Cancer Biol.* 2010. V. 20. № 2. P. 85–92.
51. Beck B., Blanpain C. // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 10. P. 727–738.
52. Dick J.E. // *Blood*. 2008. V. 112. № 13. P. 4793–4807.
53. Dick J. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. № 2. P. 131.
54. Ailles L.E., Weissman I.L. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 5. P. 460–466.
55. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. // *Annu. Rev. Med.* 2007. V. 58. P. 267–284.
56. Schatton T., Frank N.Y., Frank M.H. // *BioEssays*. 2009. V. 31. № 10. P. 1038–1049.
57. Nguyen L.V., Vanner R., Dirks P., Eaves C.J. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 2. P. 133–143.
58. Antoniou A., Hebrant A., Dom G., Dumont J.E., Maenhaut C. // *Cell Cycle*. 2013. V. 12. № 24. P. 3743–3748.
59. Schulenburg A., Blatt K., Cerny-Reiterer S., Sadovnik I., Herrmann H., Marian B., Grunt T., Zielinski C., Valent P. // *J. Hematol. & Oncol.* 2015. V. 8. № 1. P. 16.
60. Sotiropoulou P.A., Christodoulou M.S., Silvani A., Herold-Mende C., Passarella D. // *Drug Discov Today*. 2014. V. 19. № 10. P. 1547–1562.
61. Alison M.R., Lim S.M., Nicholson L.J. // *J. Pathol.* 2011. V. 223. № 2. P. 147–161.
62. Alison M.R., Lin W.R., Lim S.M., Nicholson L.J. // *Cancer Treat. Rev.* 2012. V. 38. № 6. P. 589–598.
63. Medema J.P. // *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. № 4. P. 338–344.
64. Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., Fullen D.R., Johnson T.M., Morrison S.J. // *Nature*. 2008. V. 456. № 7222. P. 593–598.
65. Hill R.P. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 4. P. 1891–1895; discussion 1890.
66. Adams J.M., Strasser A. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 11. P. 4018–4021.
67. Klevebring D., Rosin G., Ma R., Lindberg J., Czene K., Kere J., Fredriksson I., Bergh J., Hartman J. // *Breast Cancer Res.* 2014. V. 16. № 4. P. R72.
68. Chen J., Li Y., Yu T.S., McKay R.M., Burns D.K., Kernie S.G., Parada L.F. // *Nature*. 2012. V. 488. № 7412. P. 522–526.
69. Schepers A.G., Snippert H.J., Stange D.E., van den Born M., van Es J.H., van de Wetering M., Clevers H. // *Science*. 2012. V. 337. № 6095. P. 730–735.
70. Driessens G., Beck B., Caauwe A., Simons B.D., Blanpain C. // *Nature*. 2012. V. 488. № 7412. P. 527–530.
71. Humphries A., Cereser B., Gay L.J., Miller D.S., Das B., Gutteridge A., Elia G., Nye E., Jeffery R., Poulson R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 27. P. E2490–2499.
72. Wang J., Ma Y., Cooper M.K. // *Transl. Cancer Res.* 2013. V. 2. № 5. P. 429–441.

73. Gilbertson R.J., Graham T.A. // *Nature*. 2012. V. 488. № 7412. P. 462–463.
74. Xie T., Li L. // *Development*. 2007. V. 134. № 11. P. 2001–2006.
75. Scadden D.T. // *Cell*. 2014. V. 157. № 1. P. 41–50.
76. Clevers H., Loh K.M., Nusse R. // *Science*. 2014. V. 346. № 6205. P. 1248012.
77. Sneddon J.B., Werb Z. // *Cell Stem Cell*. 2007. V. 1. № 6. P. 607–611.
78. Scadden D.T. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7097. P. 1075–1079.
79. Ye J., Wu D., Wu P., Chen Z., Huang J. // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. № 5. P. 3945–3951.
80. Saltarella I., Lamanuzzi A., Reale A., Vacca A., Ria R. // *W. J. Stem Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 84–95.
81. Takakura N. // *Cancer Sci*. 2012. V. 103. № 7. P. 1177–1181.
82. Borovski T., De Sousa E.M.F., Vermeulen L., Medema J.P. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 3. P. 634–639.
83. Junttila M.R., de Sauvage F.J. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 346–354.
84. Plaks V., Kong N., Werb Z. // *Cell Stem Cell*. 2015. V. 16. № 3. P. 225–238.
85. Ghiabi P., Jiang J., Pasquier J., Maleki M., Abu-Kaoud N., Rafii S., Rafii A. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 11. P. e112424.
86. Horimoto Y., Polanska U.M., Takahashi Y., Orimo A. // *Cell Adh. Migr*. 2012. V. 6. № 3. P. 193–202.
87. Park T.S., Donnenberg V.S., Donnenberg A.D., Zambidis E.T., Zimmerlin L. // *Curr. Pathobiol. Rep*. 2014. V. 2. № 1. P. 41–52.
88. Fessler E., Dijkgraaf F.E., De Sousa E.M.F., Medema J.P. // *Cancer Lett*. 2013. V. 341. № 1. P. 97–104.
89. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C., Kaestli A.J., Wiggins P.A., Rodrigues L.O., Brooks M., Reinhardt F., Su Y., Polyak K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 19. P. 7950–7955.
90. Iliopoulos D., Hirsch H.A., Wang G., Struhl K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 4. P. 1397–1402.
91. Xie X., Teknos T.N., Pan Q. // *Stem Cells Transl. Med*. 2014. V. 3. № 10. P. 1111–1115.
92. Chaffer C.L., Marjanovic N.D., Lee T., Bell G., Kleer C.G., Reinhardt F., D'Alessio A.C., Young R.A., Weinberg R.A. // *Cell*. 2013. V. 154. № 1. P. 61–74.
93. Li Y., Laterra J. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. № 3. P. 576–580.
94. Vermeulen L., Snippert H.J. // *Nat. Rev. Cancer*. 2014. V. 14. № 7. P. 468–480.
95. Biddle A., Liang X., Gammon L., Fazil B., Harper L.J., Emich H., Costea D.E., Mackenzie I.C. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 15. P. 5317–5326.
96. Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. // *Cell Cycle*. 2013. V. 12. № 17. P. 2713–2714.
97. Xie G., Ji A., Yuan Q., Jin Z., Yuan Y., Ren C., Guo Z., Yao Q., Yang K., Lin X., et al. // *Br. J. Cancer*. 2014. V. 110. № 10. P. 2514–2523.
98. Varga J., De Oliveira T., Greten F.R. // *FEBS Lett*. 2014. V. 588. № 15. P. 2422–2427.
99. Takebe N., Miele L., Harris P.J., Jeong W., Bando H., Kahn M., Yang S.X., Ivy S.P. // *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2015. V. 12. P. 445–464. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.61.
100. MacCalli C., De Maria R. // *Cancer Immunol. Immunother*. 2015. V. 64. № 1. P. 91–97.
101. Liu H., Lv L., Yang K. // *Am. J. Cancer Res*. 2015. V. 5. № 3. P. 880–893.
102. Kaiser J. // *Science*. 2015. V. 347. № 6219. P. 226–229.
103. Jung Y., Kim W.Y. // *Arch. Pharm. Res*. 2015. V. 38. № 3. P. 414–422.
104. Jeter C.R., Yang T., Wang J., Chao H.P., Tang D.G. // *Stem Cells*. 2015. V. 33. № 8. P. 2381–2390. doi: 10.1002/stem.2007.
105. Ajani J.A., Song S., Hochster H.S., Steinberg I.B. // *Semin. Oncol*. 2015. V. 42 Suppl 1. P. S3–17.
106. Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Khramtsov Y.V., et al. // *J. Transl. Med*. 2015. V. 13. № 1. P. 78.

ОТ РЕДАКЦИИ

Онкологические заболевания ежегодно уносят миллионы людей. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние годы, все еще нельзя сказать, что рак побежден. Более того, вряд ли такая фраза может быть произнесена и через десять лет. Чем больше мы узнаем о молекулярно-клеточных основах злокачественной трансформации, тем сложнее представляются проблемы, решение которых необходимо для успешного лечения.

С современной точки зрения, рак представляет собой сово-

купность заболеваний, в основе которых лежат нарушения фундаментальных процессов метаболизма клетки. Невероятное разнообразие этих процессов определяет как происхождение и протекание злокачественной трансформации, так и совокупность подходов к лечению. Исследование этих процессов в последние десятилетия – это одновременно путь побед и поражений, и трудно сказать, что преобладает.

В настоящее время существует огромное разнообразие порой противоположных точек зрения

на онкологические заболевания. По нашему мнению, дискуссия на эту тему будет интересна всем. В этом номере мы открываем такую дискуссию статьей Т.В. Виноградовой, И.П. Чернова, Г.С. Монастырской, Л.Г. Кондратьевой и Е.Д. Свердлова «Раковые стволовые клетки: пластичность против терапии». Еще раз подчеркиваем дискуссионный характер этой публикации, она выражает мнение авторов. Тем не менее считаем, что эта публикация инициирует дальнейшую публикационную активность наших читателей.

Ждем ваших откликов!

УДК 576.3:602.9:599.323.4

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки гибридов полёвок *Microtus levis* × *Microtus arvalis*: условия, необходимые для получения и поддержания

Е. В. Григорьева^{1,2,3}, А. И. Шевченко^{1,2,3}, С. П. Медведев^{1,2,3,4}, Н. А. Мазурок^{1,2,3},
А. И. Железова¹, С. М. Закиан^{1,2,3,4*}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

³Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.04.2015

РЕФЕРАТ Культуры плюрипотентных стволовых клеток – уникальный инструмент, расширяющий экспериментальные возможности исследования и моделирования различных биологических процессов, и с каждым годом увеличивается список видов млекопитающих, для которых получены такие культуры. В представленной работе получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) гибридов от скрещивания двух видов *Microtus levis* × *Microtus arvalis* из группы обыкновенных полёвок – объекта исследования молекулярно-генетической организации генома и механизмов процесса инактивации X-хромосомы. ИПСК обыкновенных полёвок получены и поддерживаются в культуральной среде, содержащей цитокин LIF, основной фактор роста фибробластов bFGF, аскорбиновую кислоту и эмбриональную бычью сыворотку. Поддержание недифференцированного состояния в линиях ИПСК обыкновенных полёвок обеспечивается за счет активации собственных генов плюрипотентности: *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Sall4*, *Esrrb*. ИПСК способны поддерживать недифференцированное состояние на протяжении по крайней мере 28 пассажей без изменения морфологии и образовывать производные трех первичных зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы при дифференцировке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, обыкновенные полёвки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мЭСК – эмбриональные стволовые клетки мыши; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЩФ – щелочная фосфатаза; OSKM – транскрипционные факторы *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, помимо традиционного способа выделения плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) из ранних эмбрионов млекопитающих, появилась возможность индуцировать плюрипотентность с помощью репрограммирования разных типов терминально дифференцированных соматических кле-

ток [1–4]. Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию дает возможность получать неограниченное количество аутологических ИПСК любого млекопитающего, в том числе и человека. Технология репрограммирования открывает широчайшие перспективы не только для персонализированного подхода к лечению различных заболе-

ваний, но и служит инструментом для генетического моделирования множества биологических процессов, в том числе для изучения раннего эмбрионального развития, сигнальных путей и факторов, участвующих в поддержании плюрипотентности и запуске дифференцировки.

Репрограммирование дифференцированных клеток различных видов млекопитающих к плюрипотентному состоянию возможно за счет повышенной экспрессии в них генов четырех транскрипционных факторов: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (OSKM). У млекопитающих эти гены эволюционно консервативны [5, 6], а их продукты имеют существенно перекрывающийся спектр ключевых генов-мишеней, поэтому зачастую при репрограммировании клеток разных видов удается использовать генетические конструкции, экспрессирующие OSKM человека или мыши [7–10]. В настоящее время получены ИПСК мыши, человека, макаки, крысы, собаки, многих сельскохозяйственных животных и ряда других видов млекопитающих, включая степную полёвку *Microtus ochrogaster*. Условия, в которых происходит индукция и поддержание плюрипотентности, имеют межвидовые различия [11–19]. Отчасти это обусловлено видоспецифичностью сигнальных каскадов, участвующих в активации и поддержании недифференцированного состояния *in vitro*, а также связано с различными требованиями к составу среды для культивирования, например, к присутствию или отсутствию в среде сыворотки крупного рогатого скота. Индукции и поддержанию плюрипотентности способствует наличие в среде ингибиторов различных сигнальных путей, ингибиторов деацетилаз гистонов, метилтрансфераз гистонов и ДНК, а также антиоксидантов.

В представленной работе подобраны условия получения и поддержания клеток с индуцированной плюрипотентностью видов группы обыкновенных полёвок рода *Microtus*. Четыре близкородственных криптических вида *M. arvalis*, *M. levis*, *M. transcaspicus* и *M. kirgisorum*, выделяемых в группу обыкновенных полёвок, являются объектом исследования молекулярно-генетической организации генома и механизмов процесса инактивации X-хромосомы [20–28]. Для этих видов изучены гены, вовлеченные в установление и поддержание плюрипотентности, показана их консервативность, включая паттерн экспрессии [5, 6, 29]. Наличие плюрипотентных клеток обыкновенных полёвок могло бы стать подходящим инструментом для проведения молекулярно-генетических работ на видах данной группы.

Ранее нами предпринимались многочисленные попытки по получению ПСК видов группы обыкновенных полёвок рода *Microtus* из ранних предым-

плантационных бластоцист и герминальных клеток [30]. Были получены мультипотентные линии клеток предымплантационного эмбриона, такие, как трофобластные стволовые клетки и клетки экстраэмбриональной энтодермы [25, 31–33]. Однако ПСК обыкновенных полёвок получены не были. В представленной работе в экспериментах по репрограммированию соматических клеток нам впервые удалось подобрать условия, в которых возможно получение и поддержание ПСК обыкновенных полёвок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток и состав сред для их культивирования

Из эмбрионов гибридов *M. levis* × *M. arvalis* на 19 день эмбрионального развития (E19) выделяли и культивировали фибробласты кожи и клетки головного мозга. Фибробласты растили в среде DMEM/F12 (F12, Nutrient Mixture/Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco) в соотношении 1 : 1, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, FBS; Gibco), 1× Non-Essential Amino Acids (NEAA; Gibco), 1× Pen Strep (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина; Gibco), 1× GlutaMAX (Gibco). Клетки мозга первые 3 дня культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1), 10% FBS, 1× NEAA, 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX, далее переводили их в среду Снайдера: DMEM/F12 (1 : 1), 10 нг/мл bFGF (StemCell), 10 нг/мл EGF (Sigma), 2 мкг/мл гепарина (Sigma), 1× N2 Supplement (Gibco), 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX.

В первом эксперименте для индукции плюрипотентности в клетках гибридов *M. levis* × *M. arvalis* использовали две среды, позволившие получить ИПСК полёвки *M. ochrogaster* [16]. Среды готовили на основе Advanced DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco), содержащей 15% заменителя сыворотки (Knockout Serum Replacement, KSR; Gibco), 1× NEAA, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX. В первую среду добавляли ингибиторы сигнальных путей 3iR: CHIR99021 (3 мкМ, StemRD), PD0325901 (1 мкМ, StemRD), A83-01 (0.5 мкМ, Stemgent) и ROCK-ингибитор (Y-27632, 10 мкМ, StemRD), второй вариант среды не содержал ингибиторов. Обе среды содержали 1000 ед./мл LIF мыши (mLIF, Invitrogen) и 2 мкг/мл доксициклина (Sigma), который добавляли лишь на начальных этапах культивирования. Для получения и культивирования ИПСК полёвки в качестве фидерной подложки использовали эмбриональные фибробласты мыши, митотически инактивированные раствором митомицина С (10 мкг/мл, Sigma) в течение 2 ч. Пересадку первичных индивидуальных колоний на первом пассаже проводили

при помощи стеклянного капилляра, а в дальнейшем – с использованием TrypLE (Gibco).

В дальнейших экспериментах по репрограммированию в среде на основе Advanced DMEM/F12 (1 : 1), дополненной 1× NEAA, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанолом, 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX, варьировали содержание 3iR, mLIF, РКСi (Gö6983, Tocris, 5 мкМ), bFGF, аскорбиновой кислоты, KSR и FBS. В состав культуральной среды, в которой были получены ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis*, входили следующие компоненты: Advanced DMEM/F12 (1 : 1), 7% KSR (Gibco), 7% FBS (Gibco), 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX, 1000 ед./мл mLIF (Invitrogen), 10 нг/мл bFGF (StemCell), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Wako). Первоначально данная среда содержала 2 мкг/мл доксицилина (Sigma), который отменяли на 14-й день репрограммирования. ИПСК полёвки замораживали в 90% FBS и 10% DMSO.

Плазмидные конструкции, получение лентивирусов, схема трансдукции

В экспериментах использовали три плазмиды: 1) TetO-FUW-OSKM (Addgene Plasmid 20321), кодирующую репрограммирующие факторы OSKM мыши; 2) FUDeltaGW-rtTA (Addgene Plasmid 19780), несущую кДНК тетрациклинового трансаktиватора, необходимого для регуляции транскрипционной активности конструкции с OSKM, путем добавления в культуральную среду доксицилина; 3) pGpr, содержащую ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, для контроля эффективности трансдукции. Лентивирусы получали путем котрансфекции указанных плазмид с плазмидами рРAX2 (Addgene Plasmid 12260) и рMD2.G (Addgene Plasmid 12259), которые кодируют белки, необходимые для упаковки вирусных частиц, в клетки линии 293FT [34, 35]. Клетки 293FT рассаживали с плотностью 6×10^6 на культуральные флаконы T75 и инкубировали

в течение ночи. Трансфекцию осуществляли кальций-фосфатным методом [36]. Среда с вирусными частицами собирали через 48, 72 и 96 ч после трансфекции и пропускали через фильтр 0.45-мкм (Millipore). Вирусы концентрировали на ультрацентрифуге (Beckman Coulter, Optima XE-90 Ultracentrifuge) в течение 90 мин при 70000 g. Осадок вирусных частиц растворяли в 200 мкл F12/DMEM и хранили в аликвотах при -70°C.

За 1 сут до трансдукции фибробласты и клетки, выделенные из мозга, рассаживали на 12-луночные планшеты с плотностью 50 и 75 тыс. клеток на лунку соответственно. Трансдуцировали клетки 4–6 пассажа. В день трансдукции к клеткам на 14–16 ч добавляли среду с лентивирусами, полученными на основе плазмид TetO-FUW-OSKM, FUDeltaGW-rtTA или pGpr, с титром около 3×10^7 инфицирующих единиц в 1 мл (MOI 5-7.5) для каждого из лентивирусов и 4 мкг/мл полибрена (Hexadimethrine bromide, Sigma). Клетки, трансдуцированные лентивирусами с репрограммирующими факторами и тетрациклиновым трансаktиватором, через 4 сут пересаживали с использованием TrypLE в разведении от 1 : 10 до 1 : 20 (в зависимости от плотности клеток в лунке) на митотически инактивированные эмбриональные фибробласты мыши в культуральные среды, различающиеся по составу. Для определения эффективности трансдукции использовали клетки, трансдуцированные лентивирусами, содержащими pGpr, подсчитывая через 4 сут долю «зеленых» клеток, при помощи флуоресцентного микроскопа и/или проточной цитометрии.

Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы

Активность эндогенной щелочной фосфатазы (ЩФ) выявляли гистохимически согласно [37]. Клетки фиксировали, высушивая на воздухе, и инкубиро-

Таблица 1. Список используемых антител

Антитела	Источник	Каталожный номер	Тип	Рабочее разведение
SSEA1	Santa Cruz Biotechnology	sc-21702	IgM мыши моноклональные	1 : 50
OCT4	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279	IgG2b мыши моноклональные	1 : 100
SOX2	Santa Cruz Biotechnology	sc-20088	IgG кролика поликлональные	1 : 100
KLF4	Abcam	ab104846	IgG1 мыши моноклональные	1 : 200
β-III-тубулин	Covance	MMS-435P-100	IgG2a мыши моноклональные	1 : 1000
Нестин	Abcam	ab6142	IgG1 мыши моноклональные	1 : 400
α-SMA	Dako	M0851	IgG2a мыши моноклональные	1 : 100
CD90	Millipore	MAВ1406	IgG2b мыши моноклональные	1 : 100
KRT18	Millipore	MAВ3234	IgG мыши моноклональные	1 : 200
SOX17	Millipore	09-038	IgG кролика поликлональные	1 : 100

вали в растворе красителя: 100 мкМ Трис-НСl рН 9.0; 100 мкМ NaCl; 5 мкМ MgCl₂; 0.4 мкг/мл нафтол-фосфата (Sigma); 1 мкг/мл Fast Violet B Salt (Sigma), в течение 15–20 мин в темноте при комнатной температуре.

Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки фиксировали 4% формальдегидом в течение 10–15 мин при комнатной температуре. Промывали PBS и инкубировали с 0.1% Triton X-100 и 2.5% FBS (или бычьим сывороточным альбумином), растворенными в PBS, в течение 30 мин при комнатной температуре. Иммунопреципитацию с первыми антителами проводили в течение ночи при 4°C. Список первых антител, использованных в работе, приведен в табл. 1. Локализацию первых антител визуализировали при помощи вторых антител к иммуноглобулинам кролика или мыши, конъюгированных с флуоресцентными красителями Alexa 488 и Alexa 568 (Life Technologies). Ядра окрашивали DAPI (Vector Laboratories).

Дифференцировка линий клеток *in vitro* в эмбрионидных телах

Колонии недифференцированных клеток механически переносили на чашки Петри, покрытые тонким слоем 1% агарозы, в среду DMEM/F12 (1 : 1) с 10% FBS, 1× Pen Strep, 1× GlutaMAX. Образовавшиеся эмбрионидные тела культивировали в течение 7 дней в суспензии и переносили на чашки Петри, покрытые 0.1% желатином, где они распластывались. В распластанном состоянии эмбрионидные тела культивировали в течение 14–20 дней, после чего дифференцированные клетки анализировали иммунофлуоресцентным способом либо дезагрегировали TrypLE, выделяли РНК и проводили ОТ-ПЦР.

Выделение РНК, ОТ-ПЦР

РНК выделяли при помощи реагента Trizol Reagent (Ambion). Образцы обрабатывали ДНК-азой I (Turbo DNA-free, Ambion), чтобы избавиться от контаминации ДНК. кДНК синтезировали с использованием Super-ScriptIII (Invitrogen). Последовательности праймеров и условия реакций, использованные в ОТ-ПЦР, приведены в табл. 2. Для анализа транскрипции с привнесенных лентивирусов экзогенной кДНК OSKM мыши использовали праймеры и условия ОТ-ПЦР, приведенные в [34]. Для каждой пары праймеров проводили реакцию негативного контроля (ОТ-), в которой в качестве матрицы использовали реакционную смесь, содержащую все компоненты, необходимые для синтеза кДНК, за исключением обратной транскриптазы.

Бисульфитное секвенирование ДНК промоторной области гена *Oct4* полёвки

Бисульфитную модификацию и очистку геномной ДНК (500 нг) проводили с помощью набора реагентов EZ DNA Methylation – Direct Kit (Zymo Research). Модифицированную ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами:

Oct4_Reg2_f2 (5'-TAAGAGGATGGGGGGGTAGTG-AAAG-3')

Oct4_Reg2_r2 (5'-GAAATCTAAAACCAATATCSAACCATAAA-3').

Полученные продукты ПЦР клонировали с помощью pGEM-T Easy Vector System I (Promega). С использованием универсального праймера M13 Reverse секвенировали 10 случайно отобранных плазмидных клонов каждого образца ДНК. Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы QUMA (Quantification tool for Methylation Analysis, <http://quma.cdb.riken.jp/>, [38]).

Таблица 2. Праймеры и условия ПЦР

Гены	Последовательность нуклеотидов	Праймеры	Концентрация ионов Mg ²⁺ , мМ	Температура отжига, °С
<i>β-актин</i>	gacggggtcaccacactgt gagtacttgcgctcaggaggag	β-actin-1 β-actin-2	3	60
<i>Nanog</i>	agtgtcttaaggacgcagaa atctcctaattgccaatacc	Nanog_QF1 Nanog_QR1	3	60
<i>Oct4</i>	ccaagctgctgaagcagaaga tttgaatgcatgggagagcccag	OCT4-2F OCT4-5R	4	53
<i>Sox2</i>	tccatgaccagctcgcagacctac ccctcccaatccctgtttctct	Sox2F Sox2R2	3	60
<i>Sall4</i>	tcaccaacgccgtcatgttacagc ggtgggctgtgctcggataaatgt	Sall4F Sall4R	2	60
<i>Esrrb</i>	agctgcggctccttcatcaag cttgacttctggcgccctcc	ESRRB1F ESRRB4R	1.5	63

Цитогенетический анализ

Клетки фиксировали по стандартной методике [39] с некоторыми модификациями: время инкубации с бромистым этидием (0.05%) – 3 ч, с колцемидом (10 мкг/мл, Gibco) – 2 ч, время гипотонии – 15–20 мин.

Перед окрашиванием препараты инкубировали в течение ночи при 50°C. Hoechst 33258 (Sigma) в концентрации 0.05 мкг/мл готовили на сбалансированном растворе Хенкса (HBSS, Gibco). Метафазные пластинки окрашивали в растворе Hoechst 33258 в течение 10 мин, после чего препараты промывали водой и заключали в ацетатный буфер pH 5.5. Метафазы визуализировали при помощи микроскопа Ni-E (Nikon), программа Lucia.

Анализ клеток методом проточной цитометрии

Число EGFP- и SSEA1-позитивных клеток оценивали на приборах BD FACS Aria и BD FACSCanto II с использованием программы BD FACS Diva. Поверхностный антиген SSEA1 выявляли с помощью антител (sc-21702, Santa Cruz Biotechnology) по методике фирмы-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение доксициклин-зависимых ИПСК-подобных клеток полёвки и их характеристика

ИПСК обыкновенных полёвок получали с использованием лентивирусов, экспрессирующих кДНК четырех ключевых репрограммирующих факторов OSKM мыши под промотором, регулируемым доксициклином. Транскрипцией с данного промотора можно управлять, добавляя в среду антибиотик, однако для этого клетки необходимо дополнительно трансдуцировать лентивирусами, экспрессирующими кДНК тетрациклин-зависимого трансаktиватора. Эту систему, в которой экспрессию OSKM мыши контролировали, добавляя в среду доксициклин, успешно использовали ранее для получения ИПСК мыши и человека [34]. Мышь и полёвки входят в одно семейство мышевидных грызунов (Muridae) отряда Rodentia и имеют высокое сходство генов OSKM [40]. К достоинствам данной системы, по нашему мнению, относится то, что все четыре репрограммирующих фактора доставляются в клетку в составе одной вирусной частицы.

Лентивирусными конструкциями трансдуцировали клетки, выделенные из эмбрионов гибридов обыкновенных полёвок *M. levis* × *M. arvalis*, которые служат моделью для изучения феномена неслучайной инактивации X-хромосомы [27, 28]. Использовали два типа клеток гибридов: фибробласты кожи и клетки, выделенные из головного мозга. Трансдукцию проводили по следующей схеме (рис. 1А). Эффективность

трансдукции, оцененная с помощью лентивирусов, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии составляла 86.5% в фибробластах (рис. 1Б) и 75% – в клетках мозга (рис. 1В).

Плюрипотентность в клетках обыкновенных полёвок индуцировали с использованием двух вариантов среды, в которых ранее успешно получили ИПСК из фибробластов степной полёвки *M. ochrogaster* [16]. В состав первого варианта входили Advanced DMEM/F12 с добавлением 15% KSR и mLIF, второй вариант содержал те же компоненты, однако включал также коктейль ингибиторов, названный 3iR. В состав коктейля 3iR входят ингибиторы киназ MEK/ERK и GSK3b (PD0325901 и CHIR99021 соответственно), антагонист рецептора I типа TGF-β (A83-01), используемые для получения и поддержания в недифференцированном состоянии ПСК мыши и крысы, а также ингибитор ROCK, повышающий выживаемость одиночных клеток в культуре [41–46].

На 4-е сутки после трансдукции клетки гибридов *M. levis* × *M. arvalis* пересаживали на митотически инактивированные эмбриональные фибробласты мыши и добавляли выбранную для получения ИПСК среду с 3iR или без 3iR. Через 24 ч после этого появлялись первые морфологические изменения клеток, усилилась интенсивность их пролиферации. Через 5–8 дней трансдуцированные клетки, выделенные из мозга, начинали сливаться в однородные первичные колонии (рис. 1Г), тогда как трансдуцированные фибробласты не давали ПСК-подобных первичных колоний (табл. 3).

Первичные колонии, полученные при репрограммировании клеток мозга, на 10–13-е сутки от начала эксперимента пересаживали в индивидуальные лунки, дезагрегируя их стеклянным капилляром. Морфология колоний клеток была такой же, как у мЭСК – объемные плотные колонии с тесными межклеточными контактами (рис. 1Д,Е). Клетки в таких колониях имели большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, что характерно для ЭСК. После пересадки первичных колоний большинство клеток дифференцировалось уже на первом пассаже, однако около 40% сохранили ЭСК-подобную морфологию. С помощью гистохимического окрашивания в отобранных колониях клеток обнаружен разный уровень эндогенной ШФ (рис. 1Ж). Линии, в которых активность ШФ не детектировалась, из дальнейшего анализа исключали. Таким образом, по результатам анализа активности ШФ на ранних пассажах культивирования отобрали 11 линий клеток, полученных в присутствии ингибиторов (viBr; vole inhibitor Brain) и 10 – в их отсутствие (vBr). Следует отметить, что в основной массе клеток не экспрессировался

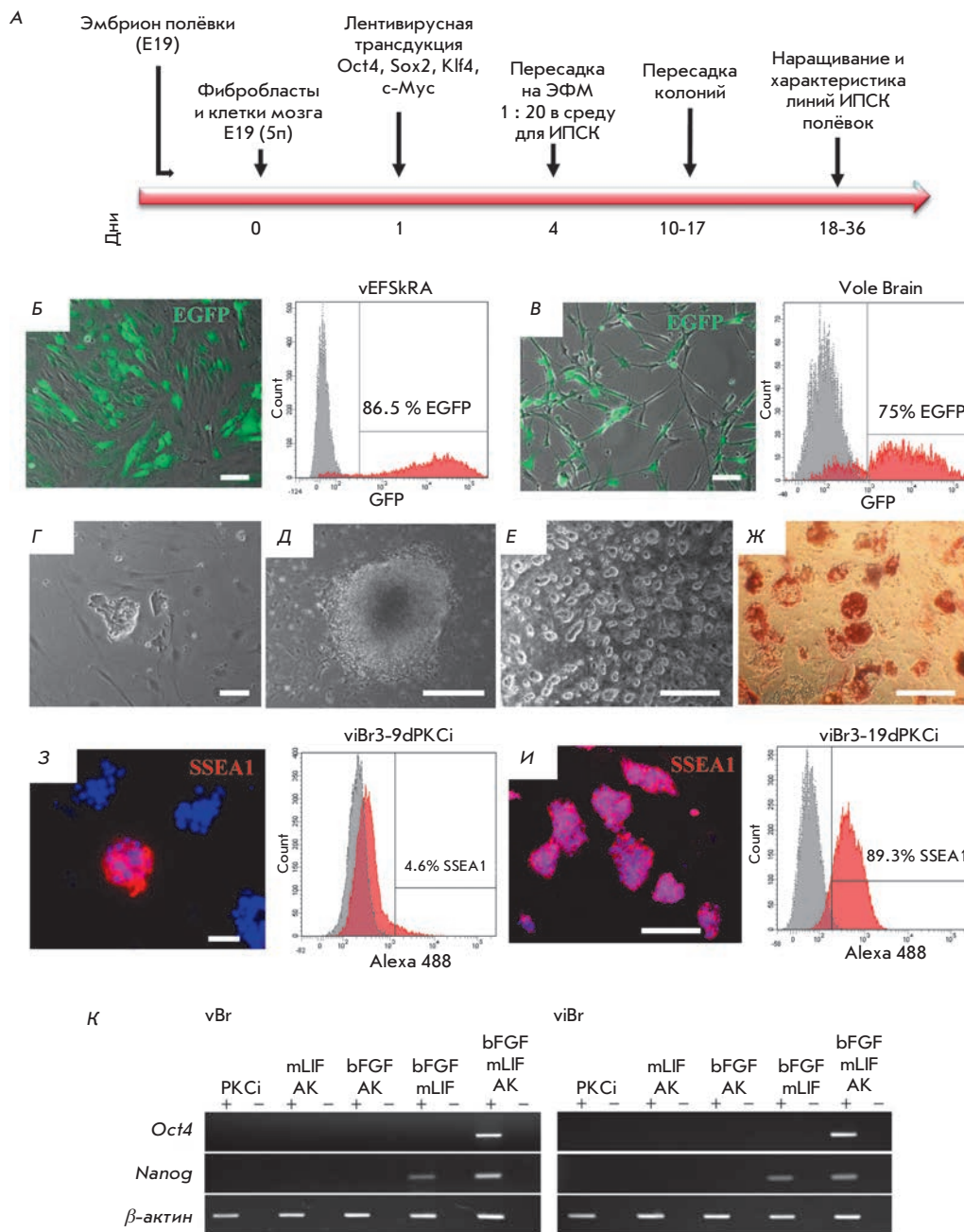


Рис. 1. Получение и характеристика доксициклин-зависимых ИПСК-подобных линий гибридных клеток *M. levis* × *M. arvalis*. **А** – схема эксперимента по получению ИПСК обычных полёвок рода *Microtus*. **Б, В** – оценка эффективности трансдукции эмбриональных фибробластов кожи (линия vEFSkRA) и клеток мозга (Vole Brain) гибридной полёвки лентивирусом, экспрессирующим EGFP (зеленый сигнал), методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Доля GFP-позитивных клеток среди фибробластов составляет 86.5%, среди клеток мозга – 75%. **Г** – морфология первичной колонии на 8-й день от начала репрограммирования клеток, выделенных из мозга. **Д** – морфология колонии на 13-й день репрограммирования клеток, выделенных из мозга. **Е** – морфология колоний клеток линии viBr3, культивируемых на среде с добавлением mLIF+3iR, 3-й пассаж. **Ж** – гистохимическое выявление активности эндогенной ЩФ в клетках линии viBr3, 2-й пассаж. **З, И** – данные иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитофлуориметрии о наличии SSEA1-позитивных клеток в линии viBr3 на 9 и 19 день культивирования в присутствии PKCi соответственно. Ядра окрашены DAPI (синий сигнал). **К** – ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *Oct4* и *Nanog* в линиях *vBr3* и *viBr3* после культивирования на протяжении трех пассажей в культуральных средах с добавлением различных компонентов. АК – аскорбиновая кислота. Масштабная линейка **Б–Г, З** – 100 мкм, **Д–Ж, И** – 500 мкм

Таблица 3. Условия, проверяемые в экспериментах по получению линий ИПСК межвидовых гибридов полёвок *M. levis* × *M. arvalis*

Тип клеток (номер эксперимента)	Количество клеток, тыс.	Эффективность трансфекции, %	Условия культивирования	Количество первичных колоний клеток ЩФ+	Число линий ИПСК
Клетки мозга (I эксп.)	37.5	75	KSR, mLIF	85	–
	37.5		KSR, mLIF, 3iR	200	–
Фибробласты (I эксп.)	25	86.5	KSR, mLIF	–	–
	25		KSR, mLIF, 3iR	–	–
Фибробласты (II эксп.)	12.5	32.9	KSR, mLIF, bFGF, АК	–	–
	12.5		KSR, mLIF, bFGF, АК, 3iR	–	–
	12.5		KSR, FBS, mLIF, bFGF, АК	70	2
	12.5		KSR, FBS, mLIF, bFGF, АК, 3iR	100	–

Примечание. АК – аскорбиновая кислота.

один из основных ранних маркеров плюрипотентности, характерный для ПСК мышцы – поверхностный антигена SSEA1. ИПСК-подобные клетки интенсивно пролиферировали в среде, содержащей доксициклин, без изменения морфологии около 40 пассажей (более 120 дней). Эти клетки пересаживали через 2–3 дня в разведении от 1 : 8 до 1 : 10, они хорошо переносят многократное замораживание в жидком азоте с последующим размораживанием без изменения фенотипических характеристик.

Мы неоднократно пытались культивировать линии клеток в отсутствие доксициклина, прекращая экспрессию трансгенных OSKM, однако пухлые колонии ИПСК-подобных клеток уплотнялись и дифференцировались уже на 2-е сутки.

Таким образом, условия культивирования, позволившие успешно получать ИПСК *M. ochrogaster*, не привели к индукции плюрипотентности в клетках гибридов *M. levis* × *M. arvalis*. При репрограммировании в этих средах фибробласты гибридов обыкновенных полёвок не формировали даже первичных колоний, а клетки, выделенные из мозга, хотя и образовывали первичные колонии, но не обнаруживали запуска механизмов самообновления, которые позволяли бы им поддерживать ИПСК-подобную морфологию при отсутствии в них экспрессии трансгенных факторов OSKM.

В дальнейшем мы сосредоточились на подборе компонентов культуральной среды, которые бы сделали возможной индукцию и поддержание плюрипотентности в клетках обыкновенных полёвок *in vitro*. С этой целью варьировали в различных сочетаниях такие компоненты среды, как mLIF, PKCi, bFGF и аскорбиновую кислоту, которые применяют для получения и поддержания культур плюрипотентных клеток других видов млекопитающих [7, 9,

13, 47–55]. Компоненты среды тестировали на двух ИПСК-подобных доксициклин-зависимых линиях, одна из которых получена и культивировалась в среде с добавлением ингибиторов (линия viBr3), а вторая (vBr3) – без ингибиторов. Интересный эффект обнаружен при добавлении в среду вещества Gö6983 – ингибитора протеинкиназы C (PKCi), способного запускать и поддерживать самообновление плюрипотентных клеток грызунов без активации сигнальных путей LIF/STAT3 или подавления ERK/GSK3 [48, 50]. В присутствии PKCi на 9-й день культивирования в обеих ИПСК-подобных линиях клеток отмечено появление 3–5% SSEA1-позитивных клеток (рис. 13), доля которых к 19-му дню увеличилась до 80–90% (рис. 1И). Однако, несмотря на экспрессию SSEA1, одного из маркеров культивируемых *in vitro* плюрипотентных клеток мышцы, крысы и *M. ochrogaster* [16, 56, 57], ИПСК-подобные клетки гибридов *M. levis* × *M. arvalis* по-прежнему дифференцировались в отсутствие доксициклина. Более значимый для репрограммирования клеток обыкновенных полёвок результат получен при использовании среды, содержащей одновременно три компонента: mLIF, bFGF и аскорбиновую кислоту, что впервые позволило нам культивировать ИПСК-подобные культуры гибридов *M. levis* × *M. arvalis* без видимых изменений в морфологии на протяжении шести пассажей в отсутствие доксициклина. При этом в культурах обнаружен запуск экспрессии собственных генов плюрипотентности *Oct4* и *Nanog* (рис. 1К). При добавлении mLIF, bFGF и аскорбиновой кислоты в культуральную среду для viBr3 и vBr3 по одному или попарно подобного эффекта не наблюдалось. Однако, поскольку viBr3 и vBr3, культивируемые без доксициклина с добавлением mLIF, bFGF и аскорбиновой кислоты, все же начинали диффе-

ренцироваться после шестого пассажа, мы решили провести второй эксперимент по репрограммированию клеток обыкновенных полёвок, используя с самого начала те условия, в которых нам удавалось некоторое время поддерживать ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis* без доксициклина.

Успешное получение доксициклин-независимых ИПСК полёвки

Новое репрограммирование гибридов *M. levis* × *M. arvalis* провели по ранее описанной схеме (рис. 1А), используя эмбриональные фибробласты кожи. Эффективность трансдукции составляла 32.9% (рис. 2А). Учитывая опыт, полученный в предыдущем эксперименте, после трансдукции лентивирусами, экспрессирующими OSKM и тетрациклин-зависимый трансактиватор, фибробласты переводили на среды для репрограммирования, содержащие mLIF, bFGF и аскорбиновую кислоту. Как и в предыдущем эксперименте, мы использовали среды с коктейлем ингибиторов 3iR и без него. Кроме того, мы варьировали содержание KSR и FBS в средах: одни среды, как и ранее, содержали 15% KSR, тогда как в состав других сред входила смесь 7% FBS и 7% KSR.

Уже на 3-й день после начала культивирования (7-й день от начала трансдукции) фибробластов на средах для репрограммирования, содержащих смесь FBS и KSR, появились первичные колонии. В средах, содержащих 15% KSR, не наблюдалось образования первичных колоний (табл. 3). На 10–14 день от начала трансдукции из культур, репрограммируемых в присутствии KSR и FBS, было пересажено шесть первичных колоний из чашки со средой 3iR и восемь колоний из чашки со средой без 3iR. Доксициклин отменили через 14 дней после начала репрограммирования, т.е. на первом пассаже после пересадки первичных колоний в индивидуальные лунки. В результате культивирования без доксициклина большая часть колоний дифференцировалась либо была отсеяна в результате первичного анализа активности ЩФ. Таким образом, были отобраны два клона 14vf2 и 14vf7, экспрессирующие ЩФ и культивируемые на среде без ингибиторов. Полученные в данном эксперименте две линии клеток культивировали в среде, содержащей 7% FBS, 7% KSR, mLIF, bFGF и аскорбиновую кислоту, без изменения морфологии на протяжении по крайней мере 28 пассажей (более 4 мес.) без добавления доксициклина. Отмена любого из компонентов среды, а именно mLIF, bFGF или аскорбиновой кислоты, а также снижение концентрации FBS ниже 7% приводило к постепенной дифференцировке полученных линий ИПСК.

Характеристика доксициклин-независимых линий клеток полёвки

Клетки полученных линий растут уплотненными колониями с плотными межклеточными контактами и четким краем, напоминая ПСК человека (рис. 2Б). Колонии клеток растут, раздвигая клетки фидера и прикрепляясь к пластику, как ЭСК/ИПСК человека, а не поверх фидера, как мЭСК. Интенсивность пролиферации линий ИПСК обыкновенных полёвок и ПСК человека была сопоставимой. Обнаружено, что добавление ингибитора ROCK в среду для культивирования существенно увеличивает выживаемость клеток при их пересадке как механической (с помощью капилляра), так и с использованием TrypLE.

Более 70% клеток в обеих линиях ИПСК имеют ожидаемое число аутосом, равное 50; X-хромосому *M. levis* и Y-хромосому *M. arvalis* (рис. 2В).

По результатам гистохимического анализа активность ЩФ выявлена в линиях клеток в недифференцированном состоянии (рис. 2Г) и не обнаружена после дифференцировки. В стабильных линиях ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis*, в отличие от доксициклин-зависимых линий, не детектируется транскрипция привнесенной конструкции с репрограммирующими факторами (рис. 2Д). Более того, в обеих линиях клеток произошло деметилирование CpG-динуклеотидов в промоторе гена *Oct4* полёвки, что свидетельствует о его реактивации (рис. 3А).

Иммунофлуоресцентным анализом показано, что полученные линии клеток в недифференцированном состоянии на ранних пассажах экспрессировали один из основных маркеров плюрипотентности – поверхностный антиген SSEA1 (рис. 2Е), что характерно для мЭСК/ИПСК. На рис. 2Е отчетливо видно, что совместная локализация окраски на ЩФ и SSEA1 наблюдается в более пухлой плотной недифференцированной части колонии, тогда как левый верхний край колонии, содержащий распластаные дифференцированные клетки, не окрашивается ни на ЩФ, ни на SSEA1. Однако через несколько пассажей нам не удалось обнаружить клетки, экспрессирующие SSEA1. Также в ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis* выявлена экспрессия ключевых генов плюрипотентного состояния *Oct4* и *Sox2*, которая устойчиво сохранялась в течение культивирования клеток (рис. 2Ж).

Методом ОТ-ПЦР в обеих линиях ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis* обнаружена экспрессия собственных генов *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Sall4*, *Esrrb*, важных для поддержания плюрипотентного состояния клеток млекопитающих. В исходной линии эмбриональных клеток кожи транскрипты этих генов отсутствуют (рис. 3Б). Таким образом, учитывая ПСК-подобную

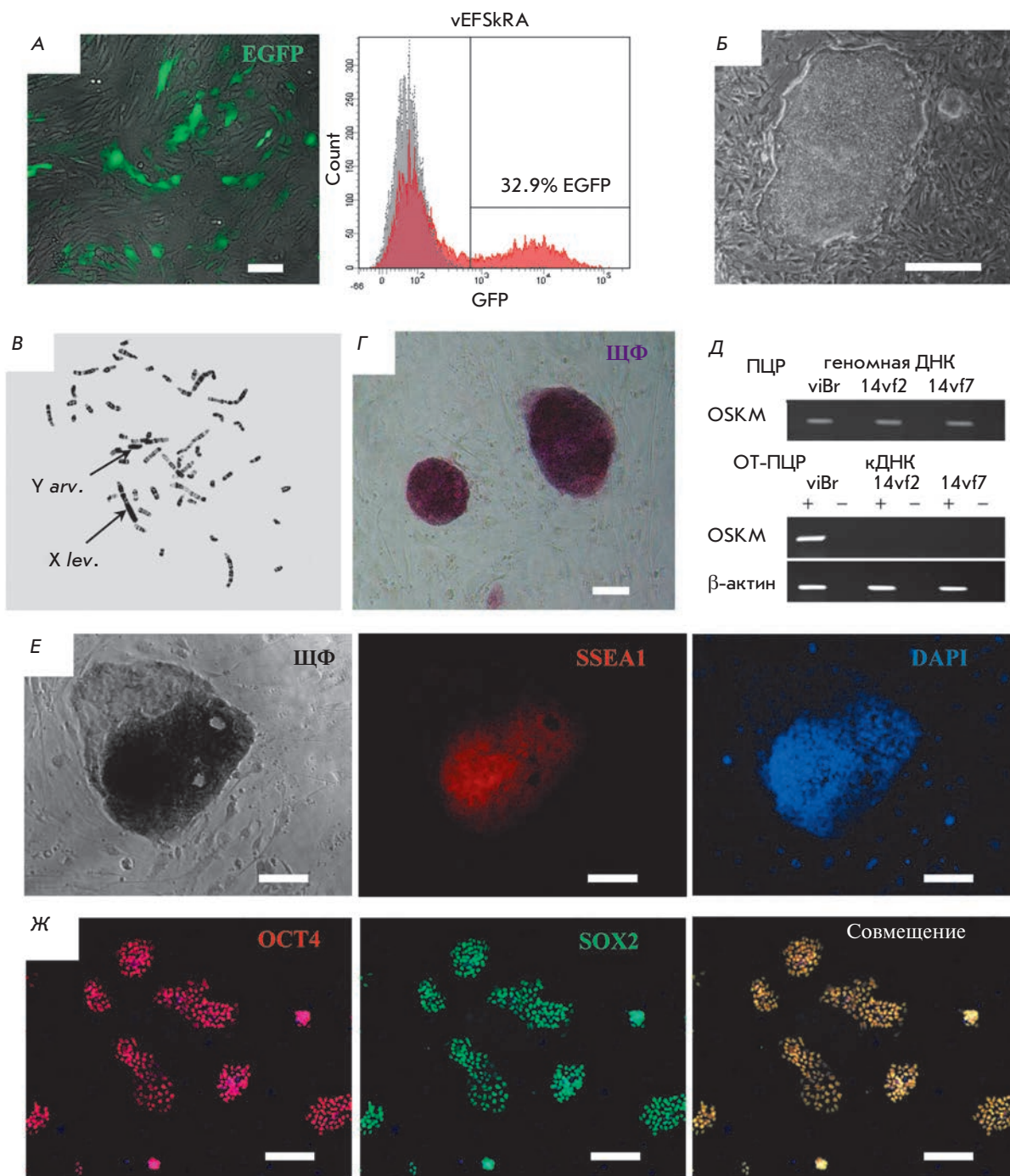


Рис. 2. Получение и характеристика ИПСК гибридов обыкновенных полёвок *M. levis* × *M. arvalis*. **А** – эффективность трансдукции эмбриональных фибробластов полёвки (vEFSkRA) лентивирусом, экспрессирующим EGFP (зеленый сигнал), и оценка доли GFP-положительных клеток (32.9%) методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. **Б** – морфология колонии клеток линии 14vf7, седьмой пассаж. **В** – метафазная пластинка 14vf7, 13-й пассаж. X lev. – X-хромосома *M. levis*, Y arv. – Y-хромосома *M. arvalis*. **Г** – гистохимическое выявление активности эндогенной ЩФ, линия клеток 14vf7, 6-й пассаж. **Д** – ОТ-ПЦР-анализ экспрессии конструкции с экзогенными факторами репрограммирования (OSKM) в линиях ИПСК гибридов обыкновенных полёвок. **Е** – иммунофлуоресцентный анализ экспрессии SSEA 1 (красный сигнал) и гистохимическая детекция активности ЩФ, линия 14vf7, 4-й пассаж. Ядра окрашены DAPI (синий сигнал). **Ж** – иммунофлуоресцентный анализ маркеров плюрипотентности OCT4 (красный сигнал) и SOX2 (зеленый сигнал). Ядра окрашены DAPI (синий сигнал). Масштабная линейка **А**, **Г**, **Е**, **Ж** – 100 мкм, **Б** – 500 мкм

морфологию колоний клеток, экспрессию ЩФ, деметилирование промотора гена *Oct4*, экспрессию в них генов *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Sall4*, *Esrrb*, неограниченную пролиферацию в культуре без изменения морфологии в отсутствие доксициклина, можно утверждать, что нам удалось получить плюрипотентные ИПСК межвидовых гибридов *M. levis* × *M. arvalis*.

Для исследования способности линий клеток к дифференцировке *in vitro* из них получили эмбрионидные тела, которые формировались в суспензионной культуре уже на 2-е сутки (рис. 4А). Анализ дифференцированных производных с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к маркерам специализированных клеточных типов выявил производные всех трех первичных зародышевых листков: эктодермы (нестин, β-III-тубулин), энтодермы (SOX17, KRT18) и мезодермы (α-SMA, CD90) (рис. 4Б).

Исследуя спонтанную дифференцировку прошедших успешное репрограммирование ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis* в культуре с использованием антител, которые выявляют исключительно эндогенные OCT4 и KLF4, мы обнаружили, что экспрессия KLF4 отсутствует в плюрипотентных клетках, но появляется в начале их дифференцировки, коррелируя с утратой транскрипционного фактора OCT4 (рис. 4В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами была предпринята попытка получить ИПСК гибридов от скрещивания между видами *M. levis* и *M. arvalis*, которые относятся к группе обыкновенных полёвок рода *Microtus*. Первые опыты по получению ИПСК обыкновенных полёвок были выполнены с использованием тех же культуральных сред и факторов, которые ранее позволили индуцировать плюрипотентность и получить ИПСК степной полёвки *M. ochrogaster* [16]. ИПСК степной полёвки были получены в присутствии заменителя эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота KSR, а также цитокина LIF, который запускает ключевой сигнальный каскад плюрипотентных клеток мыши и крысы [57–59]. Получение ИПСК *M. ochrogaster* возможно в присутствии в составе среды ингибиторов CHIR99021, PD0325901 и A83-01. Тем не менее при репрограммировании клеток обыкновенных полёвок с помощью четырех факторов OSKM с использованием сред, содержащих LIF и KSR, индукции плюрипотентности не происходило. После тщательного подбора условий ИПСК гибридов *M. levis* × *M. arvalis* были получены в среде, содержащей mLIF, bFGF, аскорбиновую кислоту, а также смесь 7% FBS и 7% KSR. Интересно, что при репрограммировании клеток *M. ochrogaster* в средах, содержащих bFGF и FBS, в большинстве

случаев не удавалось получать даже первичные ИПСК-подобные колонии.

Наш опыт показывает, что OSKM мыши, с помощью которых плюрипотентность индуцируют в соматических клетках различного типа и у разных видов, могут быть эффективны при получении ИПСК обыкновенных полёвок. Тем не менее присутствия в среде цитокина LIF, важнейшего фактора в становлении и поддержании недифференцированного состояния ЭСК и ИПСК у грызунов (мышь, крыса, а также степная полёвка) [16, 57–59], недостаточно для индукции и сохранения плюрипотентности *in vitro* в клетках обыкновенных полёвок. Этот результат согласуется с сообщениями о безуспешных попытках получить ЭСК видов группы обыкновенных полёвок из внутренней клеточной массы бластоцист в присутствии LIF мыши и полёвки *M. levis* [31]. В совокупности эти данные позволяют предполагать, что сигнальный путь, запускаемый цитокином LIF, в силу каких-то видоспецифических особенностей обыкновенных полёвок не может самостоятельно обеспечивать плюрипотентность в условиях *in vitro*.

Ключевой для индукции и поддержания плюрипотентности клеток обыкновенных полёвок стала комбинация факторов bFGF и mLIF. Известно, что bFGF участвует в запуске основного сигнального каскада ПСК у таких видов, как человек, макака, собака, корова, лошадь, овца [7, 9, 13, 15, 17, 51–55, 60–62]. Комбинация bFGF и LIF также применяется для индукции и поддержания плюрипотентности у многих видов млекопитающих, включая человека [63], кролика [13], собаку [62], лошадь [7, 17], овцу [9]. Сравнение ПСК человека, полученных и культивируемых в средах, содержащих только bFGF, а также bFGF и LIF, показало, что именно у ИПСК и ЭСК, поддерживаемых с использованием двух факторов, характеристики транскриптома и эпигенома очень близки к характеристикам плюрипотентных клеток ранних эмбрионов [63].

Важный компонент среды, позволивший осуществить репрограммирование дифференцированных клеток обыкновенных полёвок к плюрипотентному состоянию, – аскорбиновая кислота. Ранее было показано, что аскорбиновая кислота обладает антиоксидантными свойствами, а также активирует деметилазы гистонов и белки TET, ответственные за важнейшие эпигенетические преобразования при индукции плюрипотентности, что, в частности, необходимо для инициации в репрограммируемых клетках экспрессии собственных генов *Oct4* и *Nanog* [47, 49].

На многих видах млекопитающих показано, что при работе с плюрипотентными клетками предпочтительнее использовать среду с добавлением

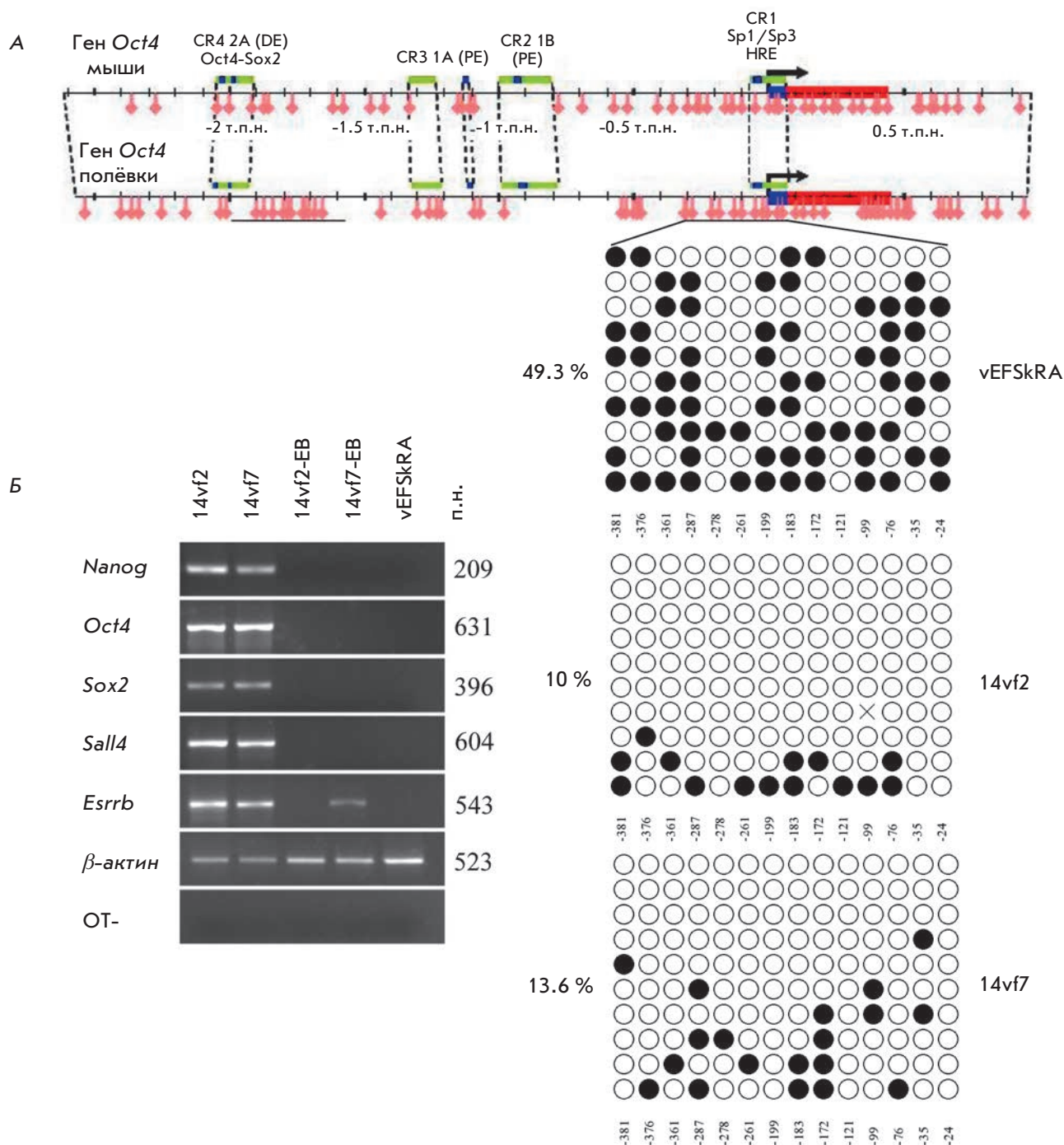


Рис. 3. Анализ метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе гена *Oct4* и экспрессии генов, характерных для плюрипотентных клеток, в ИПСК обычных полёвок. **А** – сравнение метилирования CpG-динуклеотидов промотора гена *Oct4* в полученных линиях ИПСК (14vf2, 14vf7) и исходной линии (vEFSkRA) эмбриональных фибробластов кожи. Вверху приведена схема распределения CpG-динуклеотидов в промоторе гена *Oct4* мыши и обычных полёвок. Светлые и темные кружки – неметилированные и метилированные CpG-динуклеотиды соответственно. **Б** – транскрипционная активность генов, ответственных за плюрипотентное состояние, в линиях ИПСК 14vf2 и 14vf7 и их дифференцированных производных (14vf2-EB и 14vf7-EB). Контроль – исходная линия vEFSkRA. (ОТ-) – негативный контроль реакции обратной транскрипции

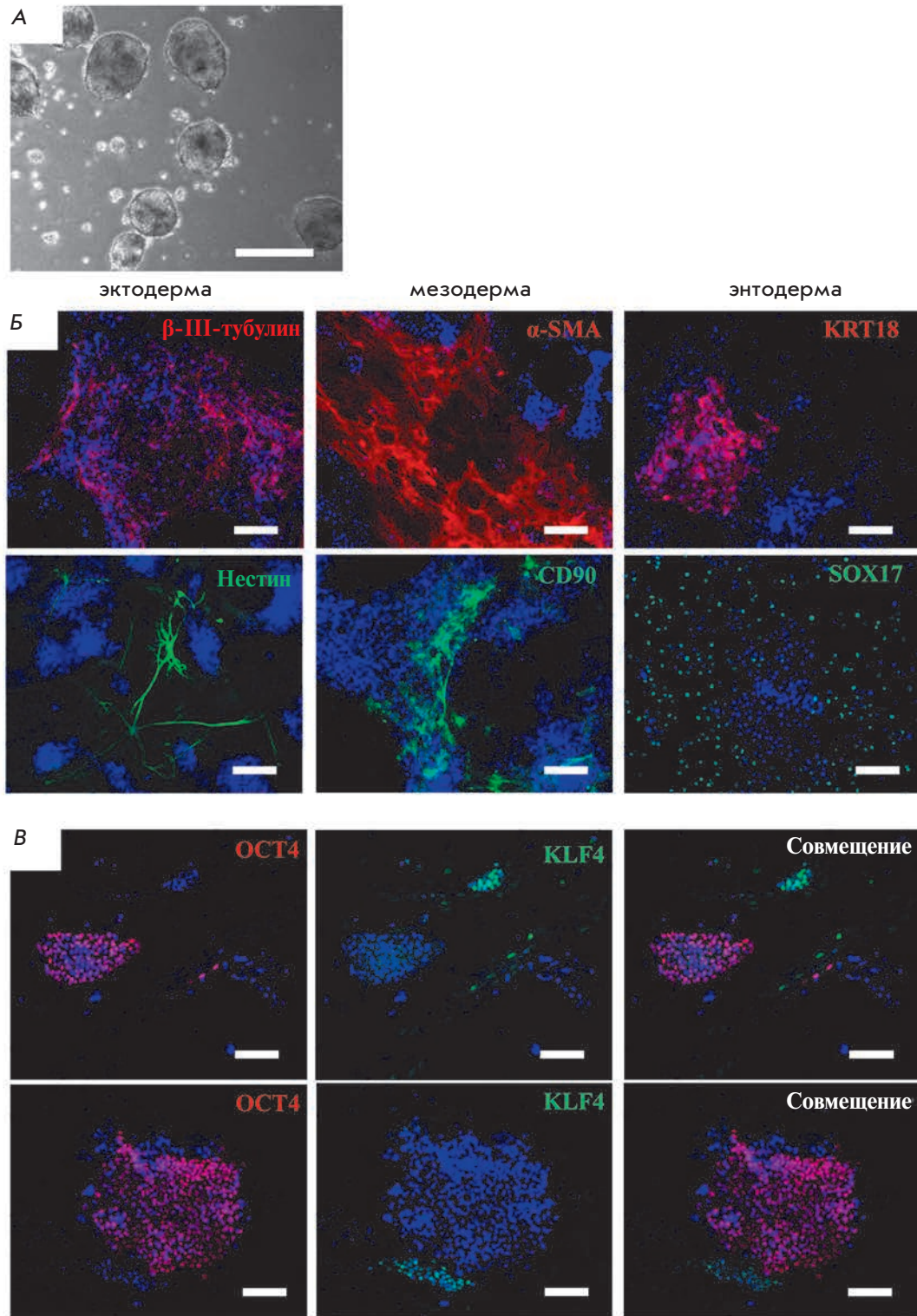


Рис. 4. Спонтанная дифференцировка ИПСК обычных полёвок. А – морфология эмбрионидных телец, сформировавшихся в суспензионной культуре за 5 сут из клеток линии 14vf2. Б – иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных производных ИПСК обычных полёвок. Выявление маркеров эктодермы: β-III-тубулин (красный сигнал), нестин (зеленый сигнал); мезодермы: α-SMA (красный сигнал), CD90 (зеленый сигнал); энтодермы: KRT18 (красный сигнал), SOX17 (зеленый сигнал). В – иммунофлуоресцентное выявление факторов транскрипции OCT4 (красный сигнал) и KLF4 (зеленый сигнал). Ядра окрашены DAPI (синий сигнал). Масштабная линейка А – 500 мкм, Б, В – 100 мкм

KSR, а не FBS [10, 13, 15, 16, 60]. Однако при репрограммировании фибробластов обыкновенных полёвок к плюрипотентному состоянию получить первичные колонии клеток удалось только на средах, содержащих не менее 7% FBS. Кроме того, замещение в культуральной среде FBS на KSR вызывает дифференцировку полученных ИПСК обыкновенных полёвок даже в присутствии факторов роста.

Присутствие в культуральной среде mLIF, bFGF, аскорбиновой кислоты, а также FBS необходимо для поддержания самообновления и плюрипотентности ИПСК обыкновенных полёвок. Удаление любого из этих компонентов приводит к запуску дифференцировки.

Полученные стабильные линии ИПСК обыкновенных полёвок имеют характерные свойства плюрипотентных клеток. Они обнаруживают активность ЩФ и экспрессируют эндогенные транскрипционные факторы Nanog, Oct4, Sox2, Esrrb и Sall4, которые необходимы для поддержания ПСК в недифференцированном состоянии [64–68]. При этом промоторная область гена Oct4 в ИПСК гипометилирована сильнее, чем в эмбриональных фибробластах. Полученные линии плюрипотентных клеток обыкновенных полёвок способны неограниченное время самообновляться и дифференцироваться *in vitro* в производные трех первичных зародышевых листков. Тем не менее, в отличие от ИПСК *M. ochrogaster*, стабильные линии клеток обыкновенных полёвок с индуцированной плюрипотентностью не поддерживают в процессе культивирования экспрессию SSEA1, а также не экспрессируют KLF4. Вероятно, это может быть связано с тем, что в поддержании плюрипотентности в ИПСК *M. ochrogaster* и обыкновенных полёвок участвуют разные сигнальные каскады. Экспрессия SSEA1 и KLF4 характерна для ПСК, в которых ключевой сигнальный каскад, обеспечивающий плюрипотентность, запускается цитокином LIF, и варьирует либо отсутствует в ПСК, плюрипотентность которых поддерживается с помощью сигнального каскада, активируемого bFGF [61, 69–71]. Так, линии плюрипотентных клеток, получаемые из постимплантационных эмбрионов мыши, в присутствии bFGF не экспрессируют KLF4, в отличие от ЭСК и ИПСК, культивируемых с LIF [71, 72]. ПСК овцы, макаки и человека, получаемые в присутствии bFGF, не обнаруживают поверхностного антигена SSEA1 [8, 15, 61, 69]. Отмечают, что плюрипотентные клетки, поддерживаемые за счет bFGF, имеют более плоскую морфологию и медленнее делятся [8, 72]. Эти два свойства bFGF-зависимых плюрипотентных клеток характерны для линий ИПСК обыкновенных полёвок. Судить же о том, насколько полно полученные ИПСК *M. ochrogaster* и обыкновенных

полёвок отражают свойства плюрипотентных клеток своих видов, пока невозможно: как у степной, так и у обыкновенной полёвки отсутствуют линии ЭСК, служащие эталоном плюрипотентности. Ничего не известно также о свойствах плюрипотентных клеток пре- и постимплантационных эмбрионов данных видов *in vivo*.

Итак, технология репрограммирования с помощью повышенной экспрессии четырех транскрипционных факторов OSKM впервые позволила получить ИПСК обыкновенных полёвок, линии плюрипотентных клеток которых до настоящего времени не удавалось ввести в культуру. Полученные линии планируется использовать для изучения процессов раннего развития и генов плюрипотентности у обыкновенных полёвок. Мы надеемся, что опыт, полученный в ходе данной работы, позволит в дальнейшем разработать более эффективные подходы к репрограммированию соматических клеток обыкновенных полёвок и выделить ЭСК из ранних предимплантационных бластоцист и герминальных клеток данных грызунов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании получены ИПСК гибридов обыкновенных полёвок *M. levis* × *M. arvalis* в среде, содержащей цитокин LIF, bFGF, аскорбиновую кислоту и FBS. Полученные в этих условиях ИПСК обыкновенных полёвок способны к самообновлению, экспрессируют гены плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2, Sall4, Esrrb, при дифференцировке *in vitro* образуют производные трех первичных зародышевых листков. Результаты нашей работы позволяют оценить разнообразие и видоспецифические особенности способов индукции и поддержания плюрипотентных клеток у разных видов млекопитающих. ●

Авторы признательны И.С. Захаровой за помощь в проведении экспериментов и обработке данных проточной цитофлуориметрии, Е.А. Елисафенко за помощь в подборе праймеров для ОТ-ПЦР, а также Е.А. Васьковой, А.В. Вялковой и Д.Р. Байзитову за участие в некоторых этапах культуральных работ. Также авторы благодарны Рудольфу Джанишу (Rudolf Jaenisch), Конраду Хочедлингеру (Konrad Hochedlinger) и Дидье Трону (Didier Trono) за плазмиды, размещенные в депозитарии Addgene. Работа на приборе BD FACS Aria выполнена в ЦКП «Проточной цитометрии» ИЦиГ СО РАН.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-03947 и бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН VI.60.1.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evans M.J., Kaufman M.H. // *Nature*. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
2. Martin G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
3. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
4. Dutta D. // *Int. J. Dev. Biol.* 2013. V. 57. № 9–10. P. 667–675.
5. Medvedev S.P., Shevchenko A.I., Elisaphenko E.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. № 162. doi: 10.1186/1471-2164-9-162.
6. Медведев С.П., Елисафенко А.И., Мазурок Н.А., Закиян С.М. // *ДАН*. 2009. Т. 425. С. 102–105.
7. Breton A., Sharma R., Diaz A.C., Parham A.G., Graham A., Neil C., Whitelaw C.B., Milne E., Donadeu F.X. // *Stem Cells Dev.* 2013. V. 22. № 4. P. 611–621.
8. Li Y., Cang M., Lee A.S., Zhang K., Liu D. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e15947.
9. Liu J., Balehosur D., Murray B., Kelly J.M., Sumer H., Verma P.J. // *Theriogenology*. 2012. V. 77. № 2. P. 338–346.
10. Wu Z., Chen J., Ren J., Bao L., Liao J., Cui C., Rao L., Li H., Gu Y., Dai H., et al. // *J. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 1. № 1. P. 46–54.
11. Bao L., He L., Chen J., Wu Z., Liao J., Rao L., Ren J., Li H., Zhu H., Qian L., et al. // *Cell Res*. 2011. V. 21. № 4. P. 600–608.
12. Ezashi T., Telugu B.P., Alexenko A.P., Sachdev S., Sinha S., Roberts R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 27. P. 10993–10998.
13. Honda A., Hirose M., Hatori M., Matoba S., Miyoshi H., Inoue K., Ogura A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 41. P. 31362–31369.
14. Liao J., Cui C., Chen S., Ren J., Chen J., Gao Y., Li H., Jia N., Cheng L., Xiao H., et al. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 1. P. 11–15.
15. Liu H., Zhu F., Yong J., Zhang P., Hou P., Li H., Jiang W., Cai J., Liu M., Cui K., et al. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 6. P. 587–590.
16. Manoli D.S., Subramanyam D., Carey C., Sudin E., van Westerhuyzen J.A., Bales K.L., Belloch R., Shah N.M. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. e38119.
17. Nagy K., Sung H.K., Zhang P., Laflamme S., Vincent P., Agha-Mohammadi S., Woltjen K., Monetti C., Michael I.P., Smith L.C., et al. // *Stem Cell Rev*. 2011. V. 7. № 3. P. 693–702.
18. Shimada H., Nakada A., Hashimoto Y., Shigeno K., Shionoya Y., Nakamura T. // *Mol. Reprod. Dev.* 2010. V. 77. № 1. P. 2.
19. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
20. Mazurok N.A., Rubtsova N.V., Isaenko A.A., Pavlova M.E., Slobodyanyuk S.Y., Nesterova T.B., Zakian S.M. // *Chromosome Res*. 2001. V. 9. № 2. P. 107–120.
21. Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Anopriyenko O.V., Mazurok N.A., Elisaphenko E.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *Chromosoma*. 2010. V. 119. № 5. P. 541–552.
22. Rubtsov N.B., Rubtsova N.V., Anopriyenko O.V., Karamysheva T.V., Shevchenko A.I., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Zakian S.M. // *Cytogenet. Genome Res*. 2002. V. 99. P. 323–329.
23. Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Elisaphenko E.A., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 8. e22771.
24. Shevchenko A.T., Mazurok N.A., Slobodyanyuk S.Y., Zakian S.M. // *Chromosome Res*. 2002. V. 10. № 2. P. 117–126.
25. Vaskova E.A., Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Grigor'eva E.V., Zhelezova A.I., Vandenberg J.L., Zakian S.M. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2. e88256.
26. Шерстюк В.В., Шевченко А.И., Мазурок Н.А., Закиян С.М. // *ДАН*. 2013. Т. 450. № 5. С. 606–608.
27. Nesterova T.B., Slobodyanyuk S.Y., Elisaphenko E.A., Shevchenko A.I., Johnston C., Pavlova M.E., Rogozin I.B., Kolesnikov N.N., Brockdorff N., Zakian S.M. // *Genome Res*. 2001. V. 11. № 5. P. 833–849.
28. Zakian S.M., Kulbakina N.A., Meyer M.N., Semenova L.A., Bochkarev M.N., Radjabli S.I., Serov O.L. // *Genet. Res*. 1987. V. 50. № 1. P. 23–27.
29. Сорокин М.А., Медведев С.П., Шевченко А.И., Слынько Н.М., Закиян С.М. // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 2. С. 282–286.
30. Мазурок Н.А., Рубцова Н.В., Григорьева Е.В., Матвеева Н.М., Железова А.И., Шилов А.Г., Слободянюк С.Я., Закиян С.М. // *Онтогенез*. 2003. Т. 34. С. 193–203.
31. Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Mazurok N.A., Elisaphenko E.A., Zhelezova A.I., Shilov A.G., Dyban P.A., Dyban A.P., Noniashvili E.M., Slobodyanyuk S.Y., et al. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. e7161.
32. Шевченко А.И., Демина В.В., Мазурок Н.А., Железова А.И., Ефремов Я.Р., Шилов А.Г., Шевела А.И., Белеванцева А.В., Власов В.В., Закиян С.М. // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 11. С. 1477–1485.
33. Григорьева Е.В., Шевченко А.И., Железова А.И., Шилов А.Г., Мазурок Н.А., Дыбан П.А., Дыбан А.П., Закиян С.М. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2010. № 4. С. 183–194.
34. Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
35. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 3. P. 340–345.
36. Kingston R.E., Chen C.A., Okayama H. // *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2003. Chapter 9. Unit 9.1.
37. Pain B., Clark M.E., Shen M., Nakazawa H., Sakurai M., Samarut J., Etches R.J. // *Development*. 1996. V. 122. № 8. P. 2339–2348.
38. Kumaki Y., Oda M., Okano M. // *Nucl. Acids Res*. 2008. V. 36. Web Server issue. W170–W175.
39. Nesterova T.B., Duthie S.M., Mazurok N.A., Isaenko A.A., Rubtsova N.V., Zakian S.M., Brockdorff N. // *Chromosome Res*. 1998. V. 6. № 1. P. 41–48.
40. Сорокин М.А., Елисафенко Е.А., Мазурок Н.А., Закиян С.М. // *ДАН*. 2013. Т. 452. № 1. С. 100–105.
41. Bechard M., Dalton S. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 8. P. 2092–2104.
42. Buehr M., Meek S., Blair K., Yang J., Ure J., Silva J., McLay R., Hall J., Ying Q.L., Smith A. // *Cell*. 2008. V. 135. № 7. P. 1287–1298.
43. Chang M.Y., Kim D., Kim C.H., Kang H.C., Yang E., Moon J.I., Ko S., Park J., Park K.S., Lee K.A., et al. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 3. e9838.
44. Chen Y., Blair K., Smith A. // *Stem Cell Reports*. 2013. V. 1. № 3. P. 209–217.
45. Li P., Tong C., Mehrian-Shai R., Jia L., Wu N., Yan Y., Maxson R.E., Schulze E.N., Song H., Hsieh C.L., et al. // *Cell*. 2008. V. 135. № 7. P. 1299–1310.
46. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. // *Nature*. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
47. Blaschke K., Ebata K.T., Karimi M.M., Zepeda-Martinez J.A., Goyal P., Mahapatra S., Tam A., Laird D.J., Hirst M., Rao A., et al. // *Nature*. 2013. V. 500. P. 222–226.
48. Dutta D., Ray S., Home P., Larson M., Wolfe M.W., Paul S. // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 4. P. 618–628.
49. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W.,

- Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
50. Rajendran G., Dutta D., Hong J., Paul A., Saha B., Mahato B., Ray S., Home P., Ganguly A., Weiss M.L., et al. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 34. P. 24351–24362.
51. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
52. Медведев С.П., Малахова А.А., Григорьева Е.В., Шевченко А.И., Дементьева Е.В., Соболев И.А., Лебедев И.Н., Шилов А.Г., Жимулев И.Ф., Закиян С.М. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 2. С. 108–110.
53. Медведев С.П., Шевченко А.И., Закиян С.М. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 3. С. 38–57.
54. Медведев С.П., Шевченко А.И., Закиян С.М. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 2. С. 18–28.
55. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 2. P. 91–92.
56. Ginis I., Luo Y., Miura T., Thies S., Brandenberger R., Gerecht-Nir S., Amit M., Hoke A., Carpenter M.K., Itskovitz-Eldor J., et al. // *Dev. Biol.* 2004. V. 269. № 2. P. 360–380.
57. Vassilieva S., Guan K., Pich U., Wobus A.M. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 258. № 2. P. 361–373.
58. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. // *Nature*. 1988. V. 336. № 6200. P. 688–690.
59. Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., Gough N.M. // *Nature*. 1988. V. 336. № 6200. P. 684–687.
60. Han X., Han J., Ding F., Cao S., Lim S.S., Dai Y., Zhang R., Zhang Y., Lim B., Li N. // *Cell Res.* 2011. V. 21. № 10. P. 1509–1512.
61. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
62. Vaags A.K., Rosic-Kablar S., Gartley C.J., Zheng Y.Z., Chesney A., Villagomez D.A., Kruth S.A., Hough M.R. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 2. P. 329–340.
63. Gafni O., Weinberger L., Mansour A.A., Manor Y.S., Chomsky E., Ben-Yosef D., Kalma Y., Viukov S., Maza I., Zviran A., et al. // *Nature*. 2013. V. 504. № 7479. P. 282–286.
64. Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. // *Cell*. 2003. V. 113. № 5. P. 643–655.
65. Chambers I., Silva J., Colby D., Nichols J., Nijmeijer B., Robertson M., Vrana J., Jones K., Grotewold L., Smith A. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7173. P. 1230–1234.
66. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2007. V. 9. № 6. P. 625–635.
67. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. // *Cell*. 2003. V. 113. № 5. P. 631–642.
68. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
69. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P.W., Beighton G., Bello P.A., Benvenisty N., Berry L.S., Bevan S., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 7. P. 803–816.
70. Osorno R., Chambers I. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2011. V. 366. № 1575. P. 2230–2237.
71. Posfai E., Tam O.H., Rossant J. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2014. V. 107. P. 1–37.
72. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.

УДК 577.352

Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев

С. С. Ефимова*, О. С. Остроумова

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

*E-mail: ssefimova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2015

РЕФЕРАТ Работа посвящена оценке величин изменения дипольного потенциала (Φ_d) мембран при адсорбции потенциальных модификаторов на липидных бислоях различного состава. С целью выявления диполь-модифицирующих свойств проверены флавоноиды, миорелаксанты, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители. Количественное описание модифицирующего действия флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей представлено в виде отношения максимального изменения дипольного потенциала бислоя при насыщении к абсолютному значению Φ_d немодифицированной мембраны. Определены коэффициенты наклона линейных зависимостей увеличения дипольного потенциала фосфолипидных бислоев от концентрации стирилпиридиновых красителей в мембраноомывающих растворах. Охарактеризованы зависимости величины изменения Φ_d от химической структуры модификаторов, а также от заряда и спонтанной кривизны липидных монослоев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дипольные модификаторы, дипольный потенциал мембраны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители, миорелаксанты, плоские липидные бислои, спонтанная кривизна, тиреоидные гормоны, флавоноиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач современной молекулярной фармакологии – поиск веществ, способных влиять на величину дипольного потенциала мембраны (Φ_d), а следовательно, регулировать процессы транспорта через плазматическую мембрану как в норме, так и при патологии. Этот скачок потенциала на границе раздела фаз бислоем–раствор возникает в результате определенной взаимной ориентации диполей мембранных липидов и адсорбированной на поверхности бислоя воды [1–4]. Дипольный потенциал мембраны зависит от ее липидного состава. Существенную роль играют степень ненасыщенности, длина и число углеводородных цепей в молекуле фосфолипидов [5–7]. Чаще всего дипольными модификаторами являются амфифильные вещества, молекулы которых имеют значительный дипольный момент и характеризуются специфической ориентацией на границе раздела фаз. Опубликованы сведения об успешном использовании дипольных модификаторов в качестве инструментов для изучения молекулярных механизмов формирования и функционирования ионных каналов, образованных различными токсинами и антимикробными агентами

[8–25]. Установлено, что дипольмодифицирующие свойства проявляют некоторые флавоноиды, стероиды, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители [1–3, 26–30].

Флавоноиды являются наиболее распространенными фенольными соединениями растительного происхождения. Это производные бензо-гамма-пирона, в основе структуры которых лежит скелет из двух бензольных колец (А и В), соединенных между собой трехуглеродным фрагментом (C₂-C₃-C₄). Классификация флавоноидов основана на степени окисленности пирана (2-фенилхромана, или кольца С). Выделяют следующие группы: халконы, флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванололы, изофлавоноиды и др. До недавнего времени считалось, что на величину дипольного потенциала мембран способны влиять только халконы, флоретин и его гликозид флорицин [1, 3, 31].

Миорелаксанты используют для снижения тонуса скелетной мускулатуры, в том числе для полного обездвиживания. Аммониевые стероиды (векуроний, панкуроний и рокуроний) относятся к недеполяризующим релаксантам. В основе структуры миорелаксантов находится стероидное ядро. Опубликованы

сведения о влиянии на φ_d некоторых стероидов. Так, показано [32], что введение в мембранообразующий раствор димиристоилфосфохолина холестерина, 6-кетохолестанола или копрастанола приводит к увеличению дипольного потенциала мембраны. Экстракция из липидного бислоя 5 α -андростан-3 β -ола приводит к увеличению мембранной проводимости, индуцированной K^+ -нонактином [20]. Этот результат указывает на то, что 5 α -андростан-3 β -ол увеличивает дипольный потенциал бислоя. Установлено [33], что стероидный гормон прегненолон уменьшает величину дипольного потенциала липосом, сформированных из смеси дипальмитоилфосфатидилхолина и холестерина.

Тиреоидные гормоны, тироксин и трийодтиронин, играют ключевую роль в регуляции метаболизма. Они представляют собой йодированные производные тирозина и отличаются друг от друга числом атомов йода и их локализацией. Показано также, что йодсодержащие гормоны щитовидной железы, как и флавоноид флоретин, уменьшают дипольный потенциал холестеринсодержащих липидных бислоев [27].

Ксантеновые красители представлены двумя группами: флуоресцеины и родамины. Первую группу образуют сам флуоресцеин и его галогенопроизводные (эритрозин, эозин, бенгальский розовый и флоксин В). Ксантеновые красители группы родамина представляют вторую группу, они являются производными флуоресцеина, в которых обе гидроксильные группы заменены алкилированными аминогруппами. Показано, что адсорбция бенгальского розового на поверхности дифитаноилфосфатидилхолиновой мембраны приводит, как и действие флоретина, к уменьшению ее дипольного потенциала [29].

Стирилпиридиновые красители серии ANEPPS и RH относятся к потенциал-чувствительным флуорохромам на основе стирилгемицианинов. Они различаются длиной углеводородных хвостов и(или) полиенового фрагмента. Эти флуоресцентные красители имеют высокий дипольный момент, образованный делокализованным положительным зарядом в пиридиновом комплексе и отрицательным зарядом сульфогруппы на другом конце молекулы. RH-красители увеличивают φ_d фосфохолиновых мембран, и эта способность падает в ряду RH 421, RH 237 и RH 160 [28].

Цель представленной работы состояла в установлении и количественном определении влияния некоторых флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и флуоресцентных красителей на дипольный потенциал липидных бислоев различного состава. Особое внимание уделено взаимосвязи между химической структурой модификаторов и выраженностью дипольмодифицирующих свойств соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали следующие реактивы: KCl, HEPES, пентан, этанол, хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО), гексадекан и сквален (Sigma, США); флоретин, флоризин, рутин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, (\pm) гидрат катехина, (\pm) гидрат таксифолина, даидзеин, 2',4',6'-моногидрат тригидроксиацетофенона (ТГАФ), 2'-гидрокси-4',6'-диметооксиацетофенон (ДГАФ), RH 421, di-8-ANEPPS, L-тироксин, 3,3',5'-трийодо-L-тиронин, бенгальский розовый, флоксин В, эритрозин, эозин Y, флуоресцеин, родамин 6G, родамин 101, бромиды панкурония, векурония и рокурония (Sigma, США); RH 160 и RH 237 (Molecular Probes, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). Химические структуры использованных модификаторов представлены в табл. 1.

Измерение изменения величины дипольного потенциала липидных бислоев

Бислойные липидные мембраны формировали по методу Монтала и Мюллера [34] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода–воздух из раствора 1 или 2 мг/мл липида в пентане. Для образования монослоев использовали ДФФХ, ДОФХ, ДОФС и ДОФЭ, а также эквимольную смесь ДОФС и ДОФЭ (ДОФС/ДОФЭ). Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита в обоих отделениях камеры (0.1 М KCl), кислотность растворов (pH 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES-КОН.

Ионофоры, наонактин или валиномицин из спиртового (7 мг/мл) или метанолового (0.8 мг/мл) раствора соответственно добавляли к водной фазе обоих отделений камеры до конечной концентрации 10^{-7} – 10^{-5} М. Известно, что флоретин в фосфолипидных мембранах менее эффективен в отношении трансмембранного тока, индуцированного K^+ -валиномицином, чем K^+ -нонактином [1]. Аналогичные результаты получены в ходе предварительных экспериментов с други-

ми флавоноидами, а также миорелаксантами, ксантеновыми красителями и тиреоидными гормонами. По этой причине изменения дипольного потенциала мембраны при введении указанных модификаторов измеряли с использованием нонактина. Установлено, что стирилпиридиновые красители в ДФФХ-бислоях менее эффективны в отношении трансмембранного тока, индуцированного K^+ -нонактином, чем K^+ -валиномицином, поэтому в экспериментах по измерению увеличения дипольного потенциала мембраны, вызванного адсорбцией этих красителей, применяли валиномицин.

Модификаторы вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле, ДМСО или воде до конечной концентрации в околомембранных растворах в диапазоне от 2.5 до 150 мкМ для флавоноидов, от 1 мкМ до 1 мМ для миорелаксантов, от 0.25 до 10 мкМ для ксантеновых красителей, от 1 до 50 мкМ для тиреоидных гормонов щитовидной железы и от 1 до 10 мкМ для стирилпиридиновых красителей.

Конечная концентрация растворителя (этанол, метанол или ДМСО) в камере не превышала 0.1%. Указанные растворители в такой концентрации не нарушали целостности и стабильности липидных бислоев. В отсутствие ионофоров дипольные модификаторы в максимальных концентрациях также не влияли на проводимость модельных мембран.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для подачи трансмембранного потенциала (V) и отведения сигнала с мембраны использовали хлорсеребряные электроды ($Ag/AgCl$), соединенные с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М KCl . Измерения проводили при комнатной температуре.

Данные обрабатывали с использованием 8-полярного фильтра Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоты фильтрации 1 кГц. Записи трансмембранных токов обрабатывали с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Проводимость мембраны (G) определяли как отношение равновесного тока, протекающего через бислоюную липидную мембрану (I), к трансмембранному потенциалу (V), равному 50 мВ. Изменение дипольного потенциала ($\Delta\phi_d$) при введении модификаторов определяли с использованием статистики Больцмана:

$$\Delta\phi_d = \frac{kT}{e} \ln\left(\frac{G_m}{G^0}\right), \quad (1)$$

где G^0 и G_m – значения равновесной K^+ -проводимости бислоя, обусловленной ионофором, до и после введения модификатора; e – заряд электрона; k – постоянная Больцмана (1.38×10^{-23} Дж/К), T – термодинамическая температура ($T = 294$ К) [1].

Средние величины изменения дипольного потенциала мембран определяли как средние арифметические значения $\Delta\phi_d$ в каждой из экспериментальных систем при измерении от трех до пяти бислоев (среднее \pm SD).

Адсорбцию флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей на поверхности липидных бислоев описывали с использованием изотермы Ленгмюра:

$$\Delta\phi_d(C) = \frac{\Delta\phi_d(\infty)C}{C + K}, \quad (2)$$

где $\Delta\phi_d(C)$ – изменение дипольного потенциала мембран при концентрации (C) модификатора в омывающем растворе, $\Delta\phi_d(\infty)$ – максимальное изменение дипольного потенциала мембран при $C \rightarrow \infty$, K – константа десорбции модификатора, характеризующая его сродство к липидной фазе [3, 26]. Величину $\Delta\phi_d(\infty)$ определяли по графику зависимости $\Delta\phi_d(C)$ как среднюю величину, соответствующую насыщению: неизменности дипольного потенциала мембран при дальнейшем увеличении концентрации модификатора. Величину K находили как тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей зависимость

$$\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\Delta\phi_d(C)} \left(\frac{1}{C}\right).$$

Погрешность $\Delta\phi_d(\infty)$ определяли как максимальную экспериментальную погрешность при измерении $\Delta\phi_d(C)$, а погрешность определения параметра K рассчитывали как погрешность частного

$$\left(\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\Delta\phi_d(C)}\right).$$

В пределах измеряемых концентраций стирилпиридиновых красителей (до 10 мкМ) эффекта насыщения не наблюдается. Дальнейшее увеличение концентрации красителя приводит к разрушению липидного бислоя. По указанным причинам для описания адсорбции на бислое стирилпиридиновых красителей применяли выражение, являющееся результатом линеаризации уравнения (2) при малых концентрациях дипольного модификатора ($C \ll K$):

$$\Delta\phi_d(C) = \beta C, \quad (3)$$

где $\beta = \frac{\Delta\phi_d(\infty)}{K}$ –

коэффициент наклона прямой зависимости увеличения дипольного потенциала бислоев от концентрации красителя в омывающем растворе [28].

Для сравнения эффективности дипольмодифицирующего действия различных модификаторов использовали относительную величину изменения дипольного потенциала (γ), которую рассчитывали как:

$$\gamma = \frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\phi_{d_{nm}}} \cdot 100\%, \quad (4)$$

где $\phi_{d_{nm}}$ – величина дипольного потенциала немодифицированной мембраны, определяемая по литературным данным. В отсутствие дипольных модификаторов дипольный потенциал ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФС- и ДОФЭ-мембран считали равным 250 ± 40 [5, 35, 36], 225 ± 20 [5], 240 ± 20 мВ [37, 38] и 220 ± 5 мВ [5, 35, 36] соответственно. Для ДОФС/ДОФЭ-бислоев $\phi_{d_{nm}}$ рассчитывали как среднее величин $\phi_{d_{nm}}$ ДОФС- и ДОФЭ-мембран. Погрешность определения γ рассчитывали как погрешность частного

$$\left(\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\phi_{d_{nm}}}\right).$$

В случае стирилпиридиновых красителей величину γ определяли как отношение изменения дипольного потенциала бислоя при 5 мкМ концентрации модификатора к $\phi_{d_{nm}}$. Считали, что агенты, обладающие «слабыми» дипольмодифицирующими свойствами, характеризуются величиной γ в диапазоне от 0 до 10%, «средними» – от 10 до 30%, «сильными» – от 30 до 60%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Флавоноиды

Известно, что адсорбция флоретина на мембране в первом приближении может быть описана изотермой адсорбции Ленгмюра (1) с характеристическими параметрами: максимальное изменение дипольного потенциала при насыщении ($\Delta\phi_d(\infty)$) и константа десорбции флавоноида (K) [3, 39]. В табл. 1 представлены величины γ (4), характеризующие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при введении различных модификаторов. Как видно из табл. 1, все флавоноиды уменьшают дипольный потенциал мембраны. По выраженности дипольмодифицирующих свойств проверяемые агенты можно условно разделить на три группы. К первой группе относятся модификаторы «малой» эффективности с величиной γ в диапазоне от 0 до 10%. Это изофлавоны даидзеин и генистин, флаванол катехин, флаванол таксифолин и синтетический флорглюцинол ТГАФ. Во вторую группу входят соединения, обладающие более выраженными дипольмодифициру-

щими свойствами, так называемой «средней» эффективностью (γ от 10 до 30%): флаванол рутин, изофлавоны генистеин и флорглюцинол ДГАФ. К третьей группе относятся самые «сильные» среди флавоноидов дипольные модификаторы, у которых величина γ варьирует от 30 до 60%. Это халконы флоретин и флорицин, флавонолы кверцетин и мирицетин, а также изофлавоны биоханин А.

Сравнивая химические структуры флавоноидов, приведенные в табл. 1, можно сделать заключение, что дипольмодифицирующие свойства модификатора связаны с наличием двойной связи в С-кольце молекулы флавоноида. В С-кольцах таксифолина или катехина отсутствует двойная связь, представленная у кверцетина, это приводит к тому, что флаванол и флаванол, имеющие изогнутую форму, практически не влияют на величину ϕ_d , в то время как адсорбция плоского флавонола на мембране вызывает значительное падение ее дипольного потенциала. Анализируя табл. 1, также можно заметить, что, как правило, величина γ тем больше, чем меньше число гидроксильных групп в молекуле флавоноида. Так, уменьшение ϕ_d при адсорбции флорицина, гликозида флоретина, меньше, чем в случае более гидрофобного агликаона флоретина. Аналогичная ситуация наблюдается и для ряда флавонолов (кверцетин/мирицетин и рутин), изофлавонов (биоханин А, генистеин и генистин) и флорглюцинолов (ДГАФ и ТГАФ). В отличие от биоханина А, изофлавоны даидзеин, несмотря на малое число гидроксильных групп, практически не влияют на величину дипольного потенциала ДФФХ-мембран. Поскольку константа десорбции даидзеина выше, чем биоханина А, можно предположить меньшее сродство первого к липидной фазе по сравнению со вторым. Еще одной возможной причиной наблюдаемых различий может быть разная ориентация даидзеина и биоханина А в мембране, обусловленная тем, что в молекуле даидзеина две гидроксильные группы расположены на противоположных концах молекулы, а в биоханине А – на одном. Следует также отметить, что константы десорбции гликозидов (флорицина, рутина и генистина) превышают этот параметр для соответствующих им агликонов (флоретина, кверцетина и генистеина). По всей вероятности, этот факт, как и меньшие изменения ϕ_d в присутствии гликозидов по сравнению с агликонами, обусловлен большей гидрофильностью гликозидов, а следовательно, их меньшим сродством к липидной фазе. Среди проверенных флавоноидов наибольшими константами десорбции обладают флорглюцинолы, ТГАФ и ДГАФ. Последнее наблюдение хорошо согласуется с результатами [40], которые показали, что коэффициент распределения ТГАФ между лецитином и водой в 8 раз меньше, чем у флоретина.

В *табл. 2* представлены характеристические параметры изотермы адсорбции на липидных бислоях различного состава самого «сильного» из флавоноидов модификатора – флоретина. Как видно из *табл. 2*, способность флоретина уменьшать φ_a зависит от вида мембранообразующего липида. ДОФЭ в результате ненасыщенности и ДФФХ благодаря разветвленности углеводородных цепей имеют тенденцию к образованию неламеллярных структур, поэтому в образованных ими бислоях возникает эластическое напряжение вследствие деформации монослоев, характеризующихся отрицательной спонтанной кривизной. Это напряжение может быть обнаружено при исследовании профиля латерального давления в бислое [41, 42]. ДОФХ формирует ламеллярные структуры, и включающие его монослои спонтанной кривизны практически не имеют. Максимальное уменьшение дипольного потенциала при адсорбции флоретина практически одинаково для ДОФХ-, ДОФЭ- и ДФФХ-мембран (*табл. 1 и 2*). Эти результаты указывают на то, что плоскость адсорбции модификатора в мембране не совпадает с областью скачка латерального давления в ДОФЭ- и ДФФХ-бислоях. При этом флоретин приблизительно в 1.5 раза менее эффективен в отношении бислоев, включающих отрицательно заряженный фосфолипид ДОФС (ДОФС или ДОФС/ДОФЭ) по сравнению с мембранами, сформированными из незаряженных фосфолипидов (ДФФХ, ДОФХ или ДОФЭ). Аналогичный результат получен [43] при изучении адсорбции флоретина на нейтральных и отрицательно заряженных монослоях из димиристоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилглицерина соответственно. Учитывая, что за уменьшение дипольного потенциала ответственна незаряженная форма флоретина [1], наблюдаемые различия не могут определяться снижением сорбции заряженной формы модификатора на ДОФС-содержащих мембранах. Об этом свидетельствует и близость значений констант десорбции флоретина для незаряженных ДФФХ, ДОФХ и ДОФЭ и заряженных ДОФС-мембран (*табл. 1 и 2*). Это позволяет утверждать, что коэффициент распределения модификатора практически не зависит от фосфолипидного состава мембраны. Подобный эффект может быть следствием положительной спонтанной кривизны монослоев из ДОФС, возникающей из-за «расталкивания» одноименно заряженных липидных голов. В результате, сорбирующиеся в этой области молекулы флоретина могут приобретать ориентацию, отличную от незаряженных мембран, и/или иметь большее число возможных конформаций.

Миорелаксанты

Как видно из *табл. 1*, добавка бромидов панкурония, векурония и рокурония в растворы, омывающие ДФФХ-мембраны, практически не влияет на их дипольный потенциал (величина γ составляет не более 2%). Можно заключить, что все исследуемые миорелаксанты обладают слабыми дипольмодифицирующими свойствами. Учитывая, что имеющий только одну гидроксильную группу насыщенный стероид 5 α -андростан-3 β -ол увеличивает дипольный потенциал липидных бислоев [20], можно предположить, что отсутствие влияния стероидных миорелаксантов на φ_a связано с модификациями, увеличивающими гидрофильность стероидной молекулы (присоединение ацетатных групп и азотсодержащих гетероциклов). Высокая гидрофильность и наличие функциональных групп на разных концах молекул панкурония, векурония и рокурония позволяют думать, что сорбированные на поверхности мембраны миорелаксанты практически не погружаются в бислой. О малой глубине погружения косвенно свидетельствует и отсутствие влияния бромида панкурония на дипольный потенциал ДОФХ-мембран (величина γ равна 3 ± 1), которые, в отличие от ДФФХ-бислоев, не испытывают скачка латерального давления в углеводородной области. При этом малые величины констант десорбции миорелаксантов (*табл. 1*) указывают на высокий коэффициент распределения этих соединений между бислоем и водным раствором.

Поверхностный заряд мембраны существенным образом сказывается на адсорбции стероидных миорелаксантов. Бромиды панкурония и векурония увеличивают дипольный потенциал отрицательно заряженных ДОФС/ДОФЭ-мембран (величина γ равна $17 \pm 3\%$), при этом более гидрофобный бромид рокурония на величину φ_a ДОФС/ДОФЭ-бислоев практически не влияет (величина γ около 1%). Зависимость эффектов от заряда мембранообразующих липидов позволяет предположить, что за изменение дипольного потенциала при введении панкурония и векурония ответственны положительно заряженные формы модификаторов. Однако в ДОФС/ДОФЭ-бислоях константа десорбции этих миорелаксантов на два порядка больше, а следовательно, сродство меньше, чем в ДФФХ-мембранах, что свидетельствует об обратном. По всей вероятности, как и в случае флоретина, наблюдаемые различия обусловлены не электростатическим взаимодействием между модификаторами и ДОФС-содержащей мембраной, а положительной спонтанной кривизной монослоя. На этом основании можно думать, что в ДОФС/ДОФЭ-бислоях панкуроний и векуроний локализируются вблизи расталкивающихся отрицательно заряженных сериновых голов.

Таблица 1. Относительные изменения величины дипольного потенциала ДФФХ мембран в присутствии различных модификаторов (γ) и их константы десорбции (K)

Класс	Дипольный модификатор	Химическая структура	γ , %	K , мкМ
Флавоноиды	Флоретин		-59 ± 12	$2.0 \pm 0.5^*$
	Флорицин		-37 ± 7	$5.1 \pm 0.2^*$
	Кверцетин		-42 ± 9	$3.3 \pm 0.5^*$
	Мирицетин		-44 ± 12	$3.3 \pm 0.2^*$
	Рутин		-17 ± 5	10.8 ± 0.5
	Биоханин А		-37 ± 10	$2.1 \pm 0.3^*$
	Даидзеин		-8 ± 4	8.8 ± 0.2
	Генистеин		-28 ± 8	$1.3 \pm 0.2^*$
	Генистин		-2 ± 2	9.6 ± 0.5
	Катехин		-1 ± 1	0.7 ± 0.2
	Таксифолин		-3 ± 1	5.8 ± 0.6
	ТГАФ		-6 ± 3	$26.4 \pm 5.6^*$
	ДГАФ		-20 ± 5	10.2 ± 0.4
Миорелаксанты	Панкуроний		2 ± 2	0.1 ± 0.1
	Векуроний		1 ± 1	0.1 ± 0.1
	Рокуроний		2 ± 2	0.1 ± 0.1

Тиреоидные гормоны	Тироксин		-24 ± 7	$3.5 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Трийодтиронин		-23 ± 7	$5.3 \pm 0.2^{\text{®}}$
Ксантеновые красители	Флуоресцеин		-2 ± 1	$0.4 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Эозин Y		-2 ± 1	$0.4 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Эритрозин		-26 ± 7	$0.8 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Бенгальский розовый		-48 ± 11	$0.2 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Флоксин В		-33 ± 7	$0.2 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Родамин 101		-9 ± 4	0.3 ± 0.1
	Родамин 6G		-4 ± 1	0.4 ± 0.1
Стирилпиридиновые красители	RH 160		15 ± 6	—
	RH 237		19 ± 4	—
	RH 421		47 ± 9	—
	di-8-ANEPPS		1 ± 1	—

[®] Результаты взяты из [44].

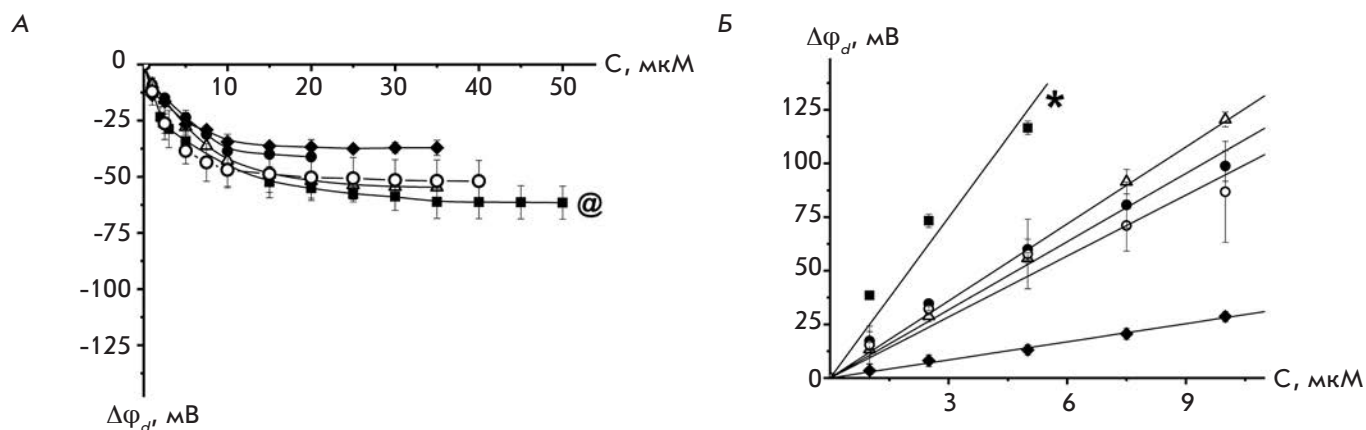
* Результаты взяты из [46].

Тиреоидные гормоны

Сравнение величин γ тиреоидных гормонов показывает, что тироксин и трийодтиронин – это дипольные модификаторы «средней» эффективности, сходным образом увеличивающие дипольный потенциал ДФФХ-мембран. Аналогичные результаты были получены ранее [27]. Этот факт позволяет предположить, что присутствие в молекуле тирокина допол-

нительного (по сравнению с трийодтиронином) атома йода слабо влияет на дипольный момент модификатора и его ориентацию в бислое.

На *рисунке А* показаны зависимости величин уменьшения дипольного потенциала ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФС-, ДОФЭ- и ДОФС/ДОФЭ-бислоев от концентрации тирокина в омывающих растворах. В *табл. 2* представлены величины γ , характеризую-



Зависимость величины изменения дипольного потенциала мембран ($\Delta\varphi_d$) от концентрации тироксина (А) и RH 421 (Б) в омывающем растворе. Мембраны сформированы из ДФФХ*[®] (■), ДОФХ (•), ДОФС (◆), ДОФЭ (Δ) и ДОФС/ДОФЭ (50/50 мол. %) (○) и омываются 0.1 М раствором КСl при pH 7.4. $V = 50$ мВ. [®] Результаты взяты из [44]. *Результаты взяты из [46]

Таблица 2. Относительные изменения величины дипольного потенциала фосфолипидных бислоев в присутствии различных модификаторов (γ) и их константы десорбции (K)

Дипольный модификатор	Параметр	ДОФХ	ДОФЭ	ДОФС	ДОФС/ДОФЭ (50/50 мол. %)
Флоретин	γ , %	-62 ± 9	-58 ± 5	-38 ± 6	-41 ± 8
	K , мкМ	$0.7 \pm 0.2^*$	$2.2 \pm 0.4^*$	$2.7 \pm 0.8^*$	2.8 ± 0.2
Тироксин	γ , %	-18 ± 5	-25 ± 4	-16 ± 5	-22 ± 6
	K , мкМ	3.8 ± 0.3	5.9 ± 0.5	2.8 ± 0.3	3.4 ± 0.2
RH 421	γ , %	27 ± 5	25 ± 2	5 ± 2	25 ± 9

* Результаты взяты из [46].

щие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при адсорбции тироксина на липидных бислоях различного состава. Из *рисунка А* и *табл. 2* видно, что эффективность тироксина мало зависит от заряда мембранообразующих липидов. Сходные результаты получены при сравнении ДФФХ- и дифитаноилфосфосериновых бислоев [44]. Отсутствие зависимости эффектов модификатора (как величин γ , так и значений K) от поверхностного заряда мембраны указывает на то, что уменьшение дипольного потенциала мембран обусловлено сорбцией незаряженной формы йодсодержащих гормонов щитовидной железы. В пользу этого свидетельствуют и данные [27]. Близость значений γ для ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ- и ДОФС-мембран дает основание утверждать, что спонтанная кривизна монослоев не сказывается на сорбции тироксина. Можно предположить, что плоскость адсорбции модификатора

располагается между областями, соответствующими скачку латерального давления в ДОФЭ- и ДФФХ-мембранах и локализации заряженных остатков серина в ДОФС-бислоях.

Ксантеновые красители

Из *табл. 1* видно, что рассмотренные в работе ксантеновые красители уменьшают дипольный потенциал ДФФХ-мембран. Оценка эффективности дипольмодифицирующего действия красителей позволяет отнести бенгальский розовый и флоксин В к наиболее эффективным модификаторам; эритрозин – к соединениям со «средней» эффективностью; а флуоресцеин, эозин Y, родамин 6G и родамин 101 – с «малой» эффективностью.

Сравнивая представленные в *табл. 1* структуры, можно заключить, что основными факторами, определяющими величину уменьшения дипольного

потенциала мембран при введении этих модификаторов, являются тип и локализация галогеновых заместителей в молекуле красителя. Можно думать, что выраженное уменьшение величины дипольного потенциала мембран при введении эритрозина обусловлено наличием в его молекуле атомов йода. Отсутствие последних во флуоресцеине или замена йода на бром в эозине У приводит к потере дипольмодифицирующих свойств этих соединений. Сходным образом замена йода на бром во флоксине В снижает эффективность модификатора по сравнению с эффективностью бенгальского розового. В этом случае выраженность дипольмодифицирующих свойств флоксина В следует отнести к присутствию в его структуре хлора. Присутствие как атомов йода, так и атомов хлора в молекуле бенгальского розового делает его самым эффективным дипольным модификатором среди изученных ксантовых красителей. Замена гидроксильной группы в молекуле флуоресцеина на аминогруппу в молекулах родаминов не влияет на способность модификаторов изменять величину дипольного потенциала бислоев.

Ранее мы показали, что за уменьшение дипольного потенциала мембраны ответственна анионная форма ксантового красителя [44].

Сравнивая величины K можно отметить, что ксантовые красители характеризуются на порядок большим сродством к фосфолипидным мембранам, чем флавоноиды и тиреоидные гормоны (табл. 1).

Стирилпиридиновые красители

Согласно [28] величина увеличения дипольного потенциала ДФФХ-мембран прямо пропорциональна концентрации стирилпиридиновых красителей в омывающих растворах в диапазоне от 0 до 15 мкМ. В табл. 1 представлены величины γ , характеризующие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при введении 5 мкМ красителя. Эти результаты позволяют построить ряд эффективности стирилпиридиновых красителей: di-8-ANEPPS не обладает дипольмодифицирующим действием, RH 160 и RH 237 характеризуются «средней», а RH 421 – наибольшей эффективностью в отношении дипольного потенциала ДФФХ-мембран. Полученные результаты согласуются с данными для красителей серии RH [28].

Способность увеличивать ϕ_d зависит от ориентации и глубины погружения красителя в мембрану. Согласно [45] глубина погружения в ДФФХ-бислой возрастает в ряду RH 160 < RH 421 < RH 237. Минимальное среди тестируемых красителей погружение RH 160 в мембрану, по всей вероятности, обусловлено его наименьшей гидрофобностью. Наибольшая эффективность RH 421 в отношении

ДФФХ-мембран при промежуточной плоскости его адсорбции может быть связана с наиболее близкой ориентацией к нормали этого красителя в мембране [45]. RH 421 и di-8-ANEPPS должны характеризоваться близким по величине дипольным моментом, поскольку имеют пиридиновые комплексы одинаковой длины. По этой причине отсутствие влияния di-8-ANEPPS на величину дипольного потенциала ДФФХ-мембран можно связать не со структурными различиями в пиридиновом комплексе, а с большей длиной углеводородных «хвостов» по сравнению с RH 421, которые определяют погружение и ориентацию красителя в бислой.

На рисунке Б представлены зависимости величин увеличения дипольного потенциала ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ-, ДОФС- и ДОФС/ДОФЭ-бислоев от концентрации RH 421 в омывающих растворах. В табл. 2 показаны величины γ , характеризующие относительное увеличение дипольного потенциала мембраны при введении 5 мкМ RH 421 в околосмембранные растворы. Зависимость дипольмодифицирующего действия RH 421 от вида мембранообразующего липида (ДФФХ, ДОФХ и ДОФС) может указывать на влияние профиля латерального давления на ориентацию красителя в бислой. Кроме того, RH 421 мало эффективен в отношении отрицательно заряженных мембран из ДОФС. Это может быть результатом расталкивания одноименно заряженных сульфатных групп модификатора и сериновых фрагментов. По всей вероятности, это способствует увеличению положительной спонтанной кривизны монослоя при адсорбции RH 421 и изменению ориентации дипольного момента красителя по сравнению с ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ- и ДОФС/ДОФЭ-мембранами. К подобному заключению пришли и при изучении каналообразующей активности антимикробных пептидов в присутствии RH 421 [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественно охарактеризовано дипольмодифицирующее действие некоторых флавоноидов, стероидных миорелаксантов, тиреоидных гормонов, ксантовых и стирилпиридиновых красителей в отношении фосфолипидных бислоев различного состава. Выявлены структурные особенности модификаторов, ответственные за их способность изменять величину дипольного потенциала мембран. Как правило, более гидрофобные соединения обладают более выраженными дипольмодифицирующими свойствами. В случае флавоноидов значение также имеют конформация молекулы и локализация гидроксильных групп, а для ксантовых красителей – тип и локализация галогеновых заместителей. Варьирование фосфолипидного состава мембран по-

зволило предсказать плоскость адсорбции наиболее эффективных соединений в каждой группе модификаторов. Изменение профиля латерального давления в бислое влияет на адсорбцию флоретина, бромидов панкурония и векурония, а также RH 421. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-14-00565), РФФИ (№ 15-34-20356), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», СП-69.2015.4 и НШ-1721.2014.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen O.S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. // J. Gen. Physiol. 1976. V. 67. P. 749–771.
2. Franklin J.C., Cafiso D.S. // Biophys. J. 1993. V. 65. P. 289–299.
3. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. // Eur. Biophys. J. 2000. V. 29. P. 172–183.
4. Wang L. // Annu. Rev. Biochim. 2012. V. 81. P. 615–635.
5. Pickar A.D., Benz R. // J. Membr. Biol. 1978. V. 44. P. 353–376.
6. Clarke R.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1327. P. 269–278.
7. Starke-Peterkovic T., Clarke R.J. // Eur. Biophys. J. 2009. V. 39. P. 103–110.
8. Sun X., Garlid K.D. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 19147–19154.
9. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 865–873.
10. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 13646–13658.
11. Luchian T., Mereuta L. // Langmuir. 2006. V. 22. P. 8452–8457.
12. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev A.P., Schagina L.V. // Langmuir. 2007. V. 23. P. 6889–6892.
13. Asandei A., Mereuta L., Luchian T. // Biophys. Chem. 2008. V. 135. P. 32–40.
14. Mereuta L., Luchian T., Park Y., Hahn K.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 373. P. 467–472.
15. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1790. P. 809–816.
16. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. // Langmuir. 2010. V. 26. P. 15092–15097.
17. Lundbaek J.A., Koeppe R.E., Andersen O.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 15427–15430.
18. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. P. 2051–2058.
19. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e25276.
20. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // PLoS One. 2012a. V. 7. P. e30261.
21. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. // PLoS One. 2012b. V. 7. P. e45135.
22. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Mikhailova E.V., Schagina L.V. // Eur. Biophys. J. 2014. V. 43. P. 207–215.
23. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // Langmuir. 2014. V. 30. P. 7884–7892.
24. Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. P. 192–199.
25. Ефимова С.С., Захаров В.В., Остроумова О.С. // Цитология. 2015. Т. 57. С. 144–152.
26. Reyes J., Greco F., Motais R., Latorre R. // J. Membr. Biol. 1983. V. 72. P. 93–103.
27. Цыбульская М.В., Антоненко Ю.Н., Тропша А.Е., Ягужинский Л.С. // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 801–805.
28. Malkov D.Y., Sokolov V.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1278. P. 197–204.
29. Kotova E.A., Rokitskaya T.I., Antonenko Yu.N. // Membr. Cell Biol. 2000. V. 13. P. 411–420.
30. Issé B.A., Yunes Quartino P., Fidelio G.D., Farias R.N. // Chem. Phys. Lipids. 2013. V. 175–176. P. 131–137.
31. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // Mol. Cell Biochem. 2008. V. 314. P. 65–71.
32. Starke-Peterkovic T., Turner N., Vitha M.F., Waller M.P., Hibbs D.E., Clarke R.J. // Biophys. J. 2006. V. 90. P. 4060–4070.
33. Alakoskela J.M., Söderlund T., Holopainen J.M., Kinnunen P.K. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 66. P. 161–168.
34. Montal M., Muller P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 65. P. 3561–3566.
35. Cseh R., Benz R. // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 1399–1408.
36. Peterson U., Mannock D.A., Lewis R.N., Pohl P., McElhaney R.N., Pohl E.E. // Chem. Phys. Lipids. 2002. V. 117. P. 19–27.
37. Flewelling R.F., Hubbell W.L. // Biophys. J. 1986a. V. 49. P. 531–540.
38. Flewelling R.F., Hubbell W.L. // Biophys. J. 1986b. V. 49. P. 541–552.
39. de Levie R., Rangarajan S.K., Seelig P.F., Andersen O.S. // Biophys. J. 1979. V. 25. P. 295–300.
40. Awiszus R., Stark G. // Eur. Biophys. J. 1998. V. 15. P. 299–310.
41. Cantor R.S. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2625–2639.
42. Bezrukov S.M. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000. V. 5. P. 237–243.
43. Lairion F., Disalvo E.A. // Langmuir. 2004. V. 20. P. 9151–9155.
44. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // J. Membr. Biol. 2014b. V. 247. P. 739–745.
45. Passechnik V.I., Sokolov V.S. // Bioelectrochemistry. 2002. V. 55. P. 47–51.
46. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // Langmuir. 2012. V. 28. P. 9908–9914.

УДК 576

Вальпроевая кислота может увеличивать потенциал гепатоцитарной дифференцировки клеток слюнной железы

О. С. Петракова^{1,2,5*}, В. В. Ашапкин³, В. Ю. Штратникова⁴, Л. И. Кутуева³, Е. А. Воротеляк^{1,2,5}, М. А. Борисов², В. В. Терских⁵, И. Г. Гвазава^{2,5}, А. В. Васильев^{1,5}

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

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

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

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

⁵Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2015

РЕФЕРАТ Изучение фенотипической пластичности и дифференцировочных способностей клеток является важной задачей клеточной биологии. В представленной работе исследована способность клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши к дифференцировке в гепатоцитарном направлении, а также проанализировано влияние вальпроевой кислоты, ингибитора гистон-деацетилаз, на эффективность дифференцировки. Показано, что после дифференцировки в клетках слюнной железы возрастает экспрессия генов гепатоцитарных маркеров (*Aat*, *Afp*, *Gbp*, *Perck*, *Tat*, *Cyp3a13*) и факторов транскрипции (*Hnf-3α*, *Hnf-3β*, *Hnf-4α*, *Hnf-6*). Вальпроевая кислота увеличивает специфичность гепатоцитарной дифференцировки, снижая экспрессию протоковых (*Krt19*, *Hhex1*, *Cyp7a1*) и ацинарных (*Ptf1a*) маркеров. После воздействия вальпроевой кислоты усиливается также эффективность гепатоцитарной дифференцировки, о чем говорит повышение уровня *Alb* и *Tdo2* и увеличение секреции мочевины дифференцированными клетками. Изменений в характере метилирования промоторных областей генов не обнаружено, однако обработка вальпроевой кислотой и гепатоцитарная дифференцировка в значительной степени затрагивают метилирование гистона H3, ассоциированного с генами, ключевыми для гепатоцитарной дифференцировки. Таким образом, клетки поднижнечелюстной слюнной железы мыши способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении, а вальпроевая кислота увеличивает специфичность и эффективность их дифференцировки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вальпроевая кислота, гепатоцитарная дифференцировка, клетки поднижнечелюстной слюнной железы, экспрессия генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ VPA – вальпроевая кислота; КСЖ – клетки слюнной железы; КСЖ-диф – дифференцированные клетки слюнной железы; КСЖ-диф-VPA – дифференцированные клетки слюнной железы, прошедшие обработку вальпроевой кислотой; ПКП – прогениторные клетки печени; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение дифференцировочных способностей клеток представляет собой одну из наиболее важных проблем современной клеточной биологии. Получение необходимого количества клеток *in vitro*

и их последующая дифференцировка могут дать материал для регенеративной медицины, а также помочь в изучении регуляции развития или тестировании лекарственных средств. Считается, что с помощью малых молекул, способных менять

эпигенетический статус клеток, можно увеличить эффективность клеточной дифференцировки *in vitro* [1]. Малые молекулы облегчают репрограммирование клеток и увеличивают эффективность дифференцировки клеток различного типа [2–5].

Вальпроевая кислота (2-пропил-пентановая кислота, VPA) используется в клинической практике в качестве эффективного противоэпилептического средства с широким спектром действия [6]. VPA ингибирует гистон-деацетилазы и вызывает неспецифичное повышение экспрессии генов [7]. Идея применения ингибиторов гистон-деацетилаз для увеличения дифференцировочных способностей клеток основана на том, что ацетилирование гистонов приводит к повышению уровня экспрессии различных генов и увеличению транскрипционного пула клетки в целом, облегчая, таким образом, клеточную дифференцировку [8].

Одну из наиболее важных проблем представляет разработка методик клеточной терапии печени. VPA обладает способностью повышать эффективность гепатоцитарной дифференцировки как плюрипотентных, так и детерминированных клеток [9, 10]. В стандартном протоколе гепатоцитарной дифференцировки VPA увеличивает способность эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши к дифференцировке в гепатоцитоподобные клетки и уменьшает степень их дифференцировки в протоковом направлении [9]. Клетки костного мозга человека эффективнее дифференцируются в гепатоцитарном направлении после обработки 5 мМ VPA. Эти клетки экспрессируют альбумин и секретируют мочевины более эффективно, чем клетки, не обработанные VPA [10]. Мезенхимные стволовые клетки пуповинной крови человека лучше подвергаются гепатоцитарной дифференцировке после воздействия 10 мМ VPA, причем прослеживается зависимость эффективности воздействия от концентрации VPA [11].

Разработка методов клеточной терапии печени осложнена недостатком клеток, способных с достаточной эффективностью восполнять функции гепатоцитов. Таким образом, поиск клеток, способных к гепатоцитарной дифференцировке, представляет важную задачу. Клетки поднижнечелюстной слюнной железы обладают высокими дифференцировочными способностями в энтодермальном направлении и могут стать перспективным источником клеток для терапии органов энтодермального происхождения [12–14]. Клетки слюнной железы (КСЖ), полученные от человека и различных животных (мышь, крыса, свинья), представляют собой активно пролиферирующую культуру *in vitro* и обладают способностью к дифференцировке в гепатоцитарном и панкреатическом направлениях [13, 15–17]. Нами

показано, что культивируемые КСЖ мыши проявляют фенотипическую конвергенцию с прогениторными клетками, полученными из печени [18]. Сравнительный *in vitro* анализ КСЖ и прогениторных клеток печени (ПКП) мыши выявил сходство в экспрессии генов клеточных маркеров: *ErCAM*, *CD29*, *c-Kit*, *Sca-1*, *c-Met*, цитокератинов 8, 18, 19, *Afr* и ряда регуляторных генов [18]. При определенных условиях культивирования КСЖ приобретают способность к синтезу инсулина или альбумина [14–16], однако гепатоцитарная и панкреатическая дифференцировка этих клеток неполная [16]. Обработка КСЖ мыши 5 мМ вальпроевой кислотой в течение 5 дней вызывает увеличение уровня экспрессии мРНК маркеров как гепатоцитарной (*G6p*, *Alb*, *Tdo*), так и панкреатической (*Ngn3*, *Pax4*, *Ins1*) дифференцировки [19]. Однако эффект от воздействия ингибиторов гистон-деацетилаз обратим и неспецифичен, поэтому целесообразно применять VPA совместно со специфическими дифференцировочными цитокинами. В представленной работе изучено влияние VPA на эффективность гепатоцитарной дифференцировки КСЖ мыши с использованием стандартного протокола [20, 21], включающего основные стадии, происходящие при созревании клеток печени. Перед гепатоцитарной дифференцировкой КСЖ обрабатывали 5 мМ вальпроевой кислотой в течение 5 дней, затем сравнивали эффективность дифференцировки клеток, подвергнутых и не подвергнутых воздействию VPA. В качестве контроля использовали культуру ПКП и КСЖ мыши на первом пассаже. Примененный подход поможет оценить влияние вальпроевой кислоты на эффективность гепатоцитарной дифференцировки КСЖ, а также изучить фенотипическую пластичность этих клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 8–15-недельного возраста, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино». Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным этическим комитетом Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Выделение и культивирование клеток

Мышей анестезировали внутривенной инъекцией хлоралгидрата (Sigma) в дозе 300 мг/кг массы тела. Обе поднижнечелюстные слюнные

железы и печень были извлечены в стерильных условиях и помещены в фосфатно-солевой буфер (PBS) с 40 мкг/мл гентамицина. После измельчения органы инкубировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco) с 0.1% коллагеназой типа IV (Sigma) в течение 30–40 мин при 37°C. Затем клетки пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм (Corning). Клеточные суспензии дважды промывали средой DMEM/F12, для осаждения клеток использовали мягкое центрифугирование (2 мин, 100 g). Клетки рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные флаконы (Corning) с плотностью 5×10^3 клеток/см² и культивировали в стандартной среде DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone), 2 мМ глутамин (Gibco), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ITS) (Invitrogen) и 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Gibco). Среду меняли каждые 3 дня. После формирования монослоя (5–7 день культивирования) клетки промывали Версеном («ПанЭко»), снимали 0.25% раствором трипсина/EDTA (Gibco) и рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные флаконы с плотностью 1×10^4 клеток/см².

Гепатоцитарная дифференцировка клеток слюнной железы

После достижения монослоя КСЖ на первом пассаже (15–20 день после выделения клеток) подвергали гепатоцитарной дифференцировке. Клетки разделяли на две группы: первую группу инкубировали с 5 мМ VPA в течение 5 дней в стандартной ростовой среде (среду с VPA меняли каждый день). Вторую группу инкубировали в течение 5 дней со стандартной ростовой средой без добавления VPA (среду также меняли каждый день). Затем в обеих группах среду заменяли на дифференцировочную, содержащую DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% FBS (HyClone), 2 мМ глутамин (Gibco), 1% ITS (Invitrogen), 0.03 мМ никотинамида (Sigma), 20 нг/мл EGF (Gibco) и 20 нг/мл гепатоцитарного фактора роста (HGF) (Invitrogen). Этот день считали первым днем дифференцировки. Дифференцировку проводили в обеих группах по одинаковому протоколу: с 1 по 5 день клетки инкубировали в дифференцировочной среде с добавлением 20 нг/мл BMP2 (Invitrogen), с 5 по 10 день – с добавлением 10 нг/мл онкостатина М (Invitrogen) и 0.1 мкМ дексаметазона (Sigma), с 10 по 15 день – с 1% N2 и 1% B27 (Invitrogen). Среду меняли каждые 3 дня. На 15-й день дифференцировки клетки анализировали в 2D- и 3D-условиях культивирования. Недифференцированные КСЖ и ПКП на первом пассаже использовали в качестве контроля.

Иммуноцитохимия

Перед проведением иммуноцитохимического окрашивания клетки рассаживали на культуральные чашки, покрытые коллагеном типа I, за 3 дня до фиксации. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течение 10 мин, промывали PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин (Sigma) и 0.1% Тритон X-100 (Sigma). Клетки инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч при 37°C. Антитела разводили в PBS в следующем соотношении: анти-альфа-фетопrotein (Afp), 1 : 200 (R&D; MAB1368); антиальбумин (Alb), 1 : 200 (R&D; MAB1455); антицитокератин 19 (Krt19), 1 : 100 (AbCam; ab15463-1). Затем клетки трижды промывали PBS и инкубировали с вторичными антителами (1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. Использовали вторичные антитела: Alexa Fluor® 488 антикроличьи IgG осли (H + L) (Invitrogen; A-21206) и Alexa Fluor® 488 антимышьиные IgG козы (H + L) (Invitrogen; A-11029). Клетки промывали 3 раза по 10 мин PBS, во время последней отмывки добавляли DAPI (Sigma). Клетки анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IX51. В качестве негативного контроля использовали окраску только вторичными антителами.

Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК выделяли с использованием AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) по инструкции производителя. Концентрацию РНК измеряли с использованием мини-флуориметра Qubit и RNA Assay Kit (Invitrogen). Для обратной транскрипции использовали Superscript II kit (Invitrogen) со случайными праймерами по инструкции производителя. В реакцию брали 500 нг тотальной РНК.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили с использованием набора с красителем EVA Green («Синтол») на приборе CFX96 (BioRad) в следующем режиме. Предварительная инкубация – 95°C, 5 мин для активации ДНК-полимеразы; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 57–59°C, 30 с; элонгация – 72°C, 45 с. Детекцию флуоресценции в канале Fam и первичную обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения прибора в автоматическом режиме. В качестве внутреннего стандарта для вычисления концентрации всех мРНК использовали мРНК гена домашнего хозяйства *Gapdh*. Список праймеров представлен в табл. 1 приложения.

Исследование метилирования ДНК методом бисульфитного секвенирования

ДНК выделяли из замороженных клеток с помощью набора GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich G1N70) по инструкции производителя. ДНК после определения концентрации с помощью мини-флуориметра Qubit (Invitrogen) обрабатывали бисульфитом натрия с использованием набора EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen). Праймеры для амплификации участков генов на модифицированной бисульфитом геномной ДНК конструировали с помощью онлайн-сервиса BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/?m=search>). Выбирали участки, соответствующие CpG-островкам (CGI) вблизи точки инициации транскрипции или, при отсутствии островков, области, непосредственно предшествующей точке инициации транскрипции. Список праймеров представлен в табл. 2 приложения. Амплификацию осуществляли в два этапа с заменой одного из праймеров на внутренний на втором этапе. В качестве матрицы на втором этапе использовали 2 мкл ПЦР-смеси, полученной на первом этапе. ПЦР проводили на приборе ДТ-322 («ДНК-Технология») с использованием набора для амплификации qPCRMix-HS SYBR+ROX («Евроген»). Условия амплификации: денатурация матрицы и активация полимеразы: 95°C, 5 мин; затем 40 циклов: 95°C, 30 с; 52–56°C (в зависимости от температуры плавления праймеров), 30 с; 72°C, 45 с; последняя элонгация: 72°C, 2 мин. Продукты амплификации фракционировали электрофорезом в 2% агарозном геле, продукты ожидаемой длины вырезали под ультрафиолетом, ДНК экстрагировали и очищали с помощью набора GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich NA1111-1KT). Полученные фрагменты секвенировали в ЦКП «Геном» (<http://www.genome-centre.ru/>) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Визуализацию результатов секвенирования и их экспорт в формате fasta осуществляли с помощью программы Sequence Scanner (<http://www.lifetechnologies.com/global/en/home/technical-resources/software-downloads/sequence-scanner-software.html>), а дальнейшую обработку с помощью онлайн-сервиса Meth Tools 2.0 (http://194.167.139.26/methtools/MethTools2_submit.html) [22].

Анализ метилирования гистонов

Фракционирование хроматина (ChIP) осуществляли с помощью антител к метилированным формам гистона H3 (Abcam: H3K4me3, № ab1012, H3K9me3, № ab8898, H3K27me3, № ab6002) и набора Imprint

Chromatin Immunoprecipitation Kit (Sigma-Aldrich CHP1) по инструкции производителя. Фракции ДНК, ассоциированные с модифицированными гистонами, амплифицировали с помощью набора полногеномной амплификации REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen 150033) по инструкции производителя. Относительное содержание изучаемых генов в ассоциированных с модифицированными гистонами фракциях ДНК определяли с помощью ПЦР-РВ. Для сравнения использовали суммарную геномную ДНК из тех же самых клеток. ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRMix-HS SYBR+ROX («Евроген»), в реакцию брали 50 нг ДНК-матрицы. Праймеры для ПЦР-РВ представлены в табл. 3 приложения. По соотношению пороговых циклов в реакциях с H3Kme-ассоциированными образцами ДНК, с одной стороны, и контрольной геномной ДНК, с другой, определяли относительную степень обогащения каждой фракции участками изучаемых генов.

Анализ секреции мочевины

Способность клеток секретировать мочевины анализировали в 3D-условиях культивирования в коллагеновом геле. Коллаген типа I растворяли в стерильной 0.1% уксусной кислоте до концентрации 5 мг/мл. В отдельную пробирку последовательно добавляли следующие компоненты: NaOH (Sigma) до концентрации 0.023 мМ, Na₂CO₃ («ПанЭко») до 0.26%, ×10 DMEM (Sigma) до ×1, 100% GlutaMax (Gibco) до 2 мМ, 100% HEPES (Gibco) до 1%, FBS (HyClone) до 10%. Затем добавляли раствор коллагена до конечной концентрации 4%. Суспензию клеток вносили в PBS, концентрация клеток – 1×10^6 на 1 мл геля. Гель инкубировали в чашках Петри при 37°C в течение 30 мин, после полимеризации геля в чашки добавляли по 2 мл среды культивирования. Клетки в геле культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях.

Концентрацию мочевины определяли в среде культивирования с помощью набора Urea Assay Kit (BioVision) по инструкции производителя. Пробы среды в 3D-условиях культивирования отбирали на 1, 5, 10 и 15 день инкубации клеток в геле. За 24 ч до взятия пробы среду культивирования заменяли средой DMEM/F12 без сыворотки. Количество мочевины определяли по интенсивности хромогенной реакции на планшетном ридере Start Fax 2100 (Awareness Technology Inc.).

Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили на культурах, полученных от трех разных животных. Каждая процедура была проведена в трех технических повторах, осуществляемых в одинаковых условиях. При оценке

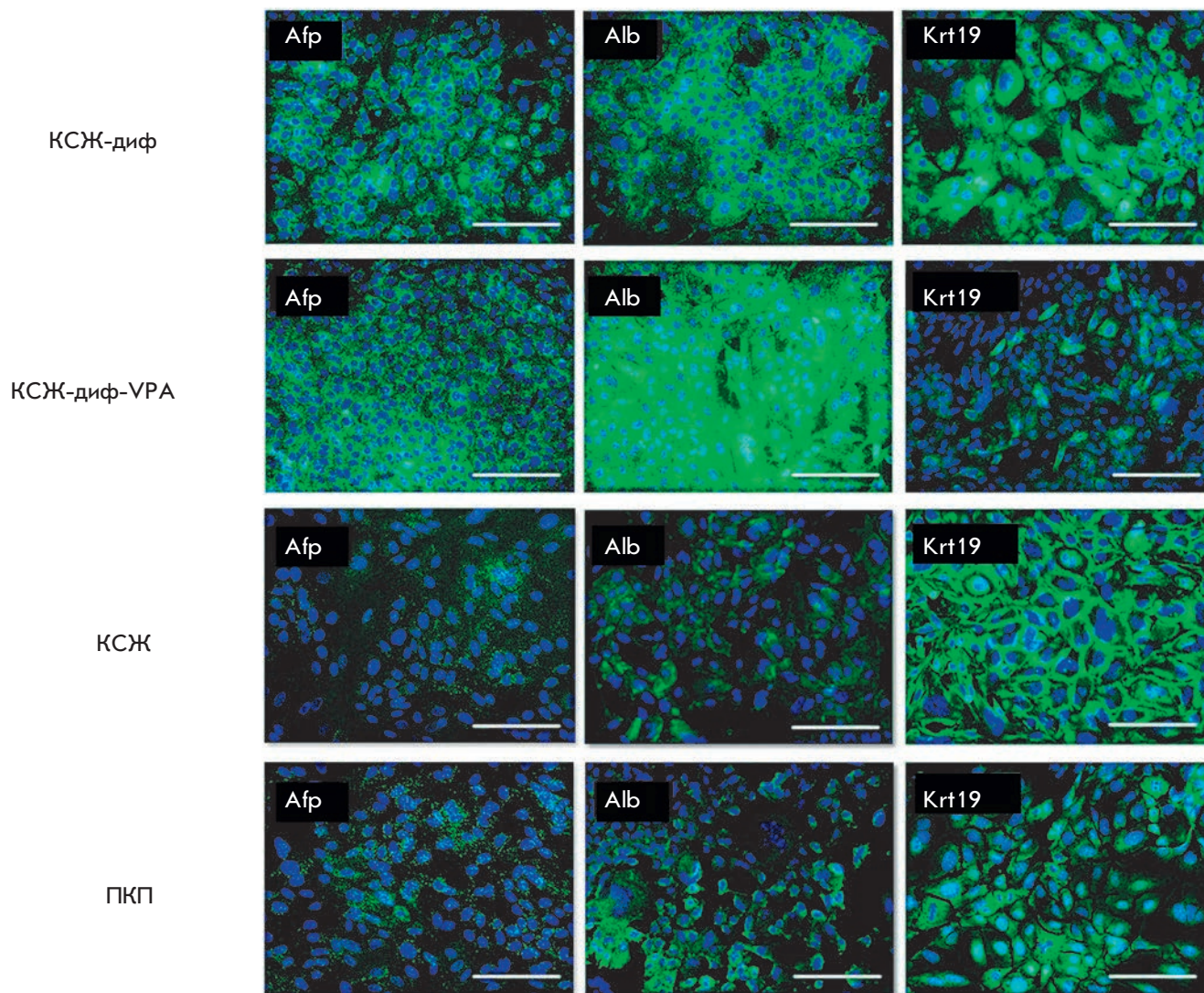


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ гепатоцитарной дифференцировки, флуоресцентная микроскопия. Ядра окрашены DAPI (синий), антигены окрашены антителами Alexa Fluor 488 (зеленый), размер шкалы 100 мкм

статистической значимости различий показателей использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммуноцитохимическое окрашивание и ПЦР-РВ выявляют увеличение экспрессии гепатоцитарных маркеров и уменьшение экспрессии протоковых маркеров в клетках слюнной железы, обработанных вальпроевой кислотой

На 15-й день гепатоцитарной дифференцировки клетки окрашивали антителами к альбумину (Alb, маркер гепатоцитов), альфа-фетопротейну (Afp, маркер прогениторных клеток печени) и цитокера-

тину 19 (Krt19, маркер прогениторных и протоковых клеток). Дифференцированные КСЖ, подвергнутые обработке ВРА, были названы КСЖ-диф-ВРА, дифференцированные КСЖ, не обработанные ВРА, названы КСЖ-диф.

КСЖ и ПКП на первом пассаже экспрессируют Krt19, слабо экспрессируют Afp и Alb (рис. 1). В ПКП Krt19 локализуется около ядра, а в КСЖ также под клеточной мембраной. После дифференцировки экспрессия Afp и Alb в КСЖ увеличивается, причем после воздействия ВРА уровень экспрессии Alb значительно возрастает (рис. 1), и происходит потеря локализации Krt19 под мембраной клетки. Кроме того, в КСЖ-диф-ВРА значительно снижается уровень экспрессии Krt19.

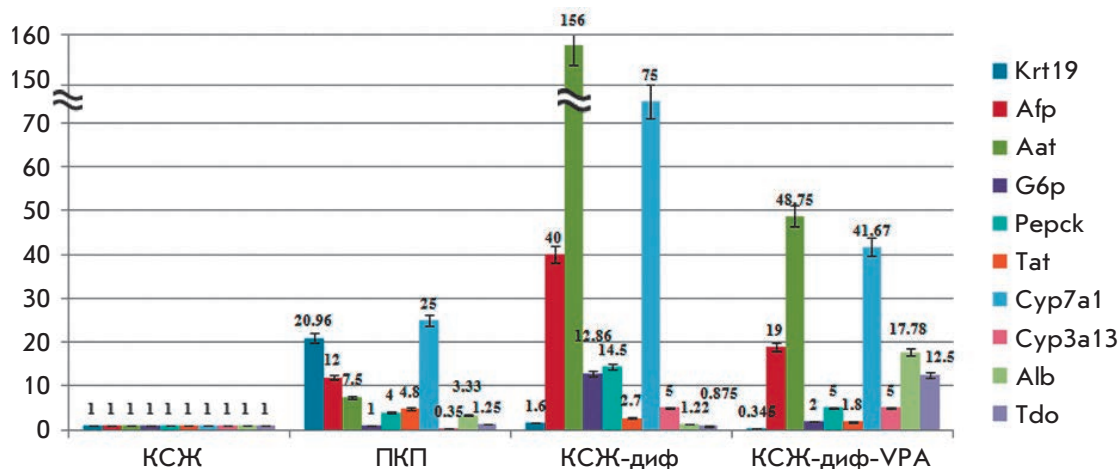


Рис. 2. Анализ методом ПЦР-РВ уровня экспрессии генов маркеров гепатоцитарной дифференцировки

Методом ПЦР-РВ в целом подтверждены результаты, полученные при иммуноцитохимическом исследовании. Для удобства интерпретации результатов после нормирования по *Gapdh* уровни экспрессии генов в КСЖ на первом пассаже принимали равными 1. В остальных культурах уровни экспрессии генов выражали относительно КСЖ на первом пассаже (рис. 2, 3).

В КСЖ-диф значительно увеличивается экспрессия мРНК ранних маркеров дифференцировки *Aat* и *Afp* (рис. 2). Возрастает также экспрессия маркеров гепатоцитов *G6p*, *Pcpk*, *Tat* и *Cyp3a13*, но не поздних дифференцировочных маркеров *Alb* и *Tdo*. В КСЖ-диф-VPA уровни экспрессии ранних маркеров *Aat* и *Afp* увеличиваются в меньшей степени, чем в КСЖ-диф, однако экспрессия поздних дифференцировочных маркеров *Alb* и *Tdo* значительно возрастает по сравнению с КСЖ-диф (рис. 2). Экспрессия гена протокового маркера *Krt19* в КСЖ-диф-VPA снижается, а характерного для протоковых клеток цитохрома P450 7a1 возрастает после дифференцировки, однако в КСЖ-диф-VPA в меньшей степени (рис. 2).

Экспрессию генов транскрипционных факторов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, также анализировали методом ПЦР-РВ. На первом пассаже в культуре ПКП выявлен высокий уровень экспрессии гепатоцитарных ядерных факторов *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Hnf-6*. Однако экспрессия раннего маркера энтодермы *Hnf-3α* была выше в КСЖ (рис. 3). В КСЖ-диф уровни экспрессии *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Hnf-6* увеличивались до значений, наблюдаемых в культуре ПКП. Наряду с этим, в КСЖ-диф возрастает экспрессия раннего маркера дифференцировки (*Tbx3*), а также транскрипционных факторов, необходимых для протоковой (*Hhex1*) и ацинарной (*Ptf1a*)

дифференцировки (рис. 3). VPA неоднозначно влияет на экспрессию транскрипционных факторов. С одной стороны, экспрессия *Hhex1* снижается, а *Tbx3* и *Ptf1a* увеличивается незначительно, что может говорить о повышении специфичности дифференцировки. С другой стороны, экспрессия *Hnf-4α* не увеличивается.

В целом, в дифференцированных КСЖ мыши значительно возрастает экспрессия факторов транскрипции, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, и ранних гепатоцитарных маркеров (*Afp* и *Aat*). Увеличение экспрессии более поздних дифференцировочных маркеров (*G6p*, *Pcpk*, *Tat*, *Alb* и *Tdo*) выражено слабее. Таким образом, в 2D-условиях культивирования инициируется гепатоцитарная дифференцировка и осуществляются ее начальные этапы. Эффект от воздействия VPA на дифференцировку КСЖ не однозначен. С одной стороны, экспрессия маркеров протокового направления (*Krt19* и цитохрома P450 7a1) снижается, а маркеров гепатоцитов – *Alb* и *Tdo* – повышается, что может говорить об ускорении процесса дифференцировки. С другой стороны, уровень экспрессии более ранних гепатоцитарных маркеров в КСЖ-диф-VPA, как правило, ниже, чем в КСЖ-диф. Не исключено, что КСЖ-диф-VPA находятся в более поздней стадии гепатоцитарной дифференцировки, для которой характерен низкий уровень экспрессии ранних дифференцировочных маркеров. Кроме того, известно, что гены *Afp* и *Aat* в норме экспрессируются в клетках слюнных желез. Увеличение экспрессии *Aat* в протоковых отделах слюнных желез наблюдается в процессе их дифференцировки и развития [23, 24]. Изначально культура КСЖ представлена малодифференцированными клетками. В ходе гепатоцитарной дифференцировки могут возникать более поздние диффе-

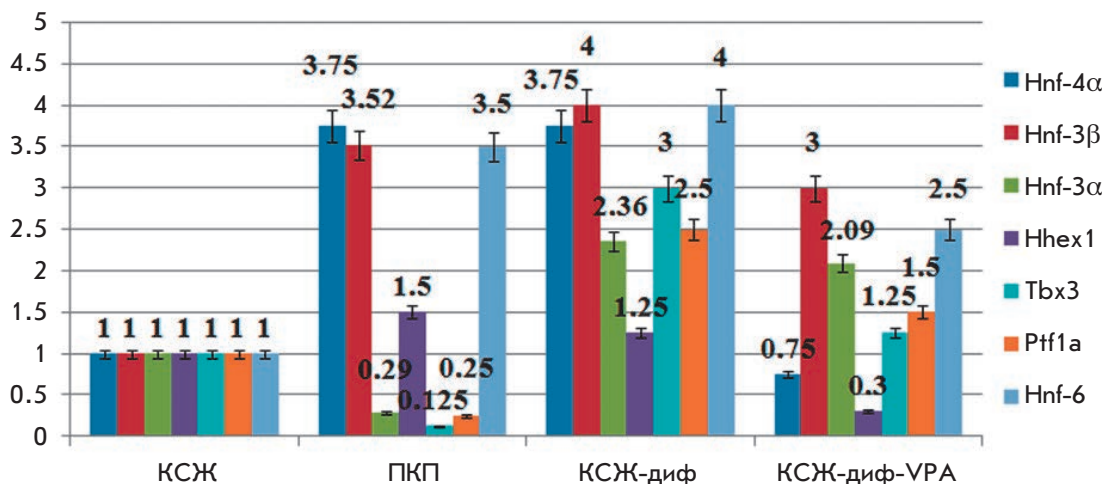


Рис. 3. ПЦР-РВ-анализ экспрессии генов транскрипционных факторов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки

ренцировочные стадии, характерные для слюнной железы, т.е. наблюдаемое нами различие в экспрессии *Afp* и *Aat* в культурах КСЖ-диф и КСЖ-диф-VPА может также отображать различную степень их собственной дифференцировки. В этом случае уменьшение экспрессии этих генов в КСЖ-диф-VPА может говорить о повышении специфичности гепатоцитарной дифференцировки и об уменьшении коммитирования, свойственного слюнным железам.

Анализ метилирования ДНК не выявил значительных изменений метилирования промоторных областей генов, ключевых для гепатоцитарной дифференцировки, в дифференцированных клетках слюнной железы

Проанализирован характер метилирования генов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, в культурах КСЖ, ПКП и КСЖ-диф-VPА на первом пассаже. Анализировали участки, соответствующие CpG-островкам, вблизи точки инициации транскрипции или, в случае отсутствия островков, области, непосредственно предшествующей точке инициации транскрипции. В большинстве случаев метилирование именно этих областей наиболее существенно для экспрессии генов. В графическом виде, сгенерированном онлайн-сервисом Meth Tools 2.0, характер метилирования генов представлен на рис. 4.

Показано, что метилирование ДНК сходно во всех трех проанализированных культурах. Часть CpG-островка гена *Gata4*, находящаяся в промоторной области, практически не метилирована, а метилированные остатки цитозина расположены ниже точки инициации транскрипции. Ген *Gata6* практически не метилирован. Возможно, во всех трех культурах эти гены активны или находятся в преактивиро-

ванном состоянии. Промоторная область гена *Hnf-1α* сильно метилирована во всех культурах, однако она не является CpG-островком, а представляет собой спорадические CpG-сайты, поэтому не ясно, как данное метилирование влияет на экспрессию. Ген *Hnf-3β* метилирован сильно и одинаково во всех трех культурах, что может говорить о его устойчивой репрессии, хотя CpG-островок находится не в промоторной, а в начале кодирующей области. Известны случаи, когда подобное метилирование не препятствует транскрипции. Ген *Alb* метилирован довольно сильно и практически одинаково во всех культурах. Это может означать, что он устойчиво репрессирован в клетках всех трех типов, или метилирование данного участка не существенно для транскрипции.

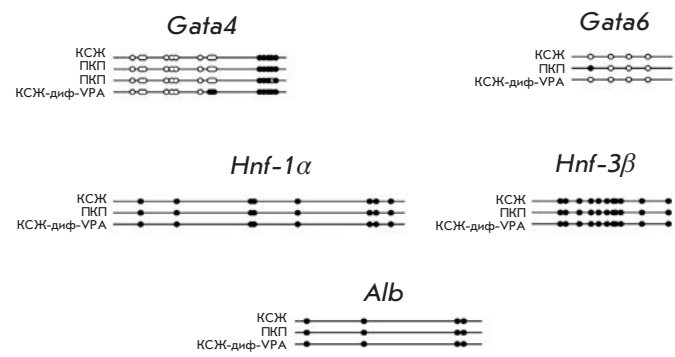


Рис. 4. Анализ метилирования ДНК в промоторной области генов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки. Пустой кружок – неметилированные динуклеотиды CpG, сплошной кружок – метилированные

Таким образом, не выявлено значительных различий в метилировании ДНК промоторных областей большинства исследованных генов в трех клеточных культурах. По всей видимости, специфический контроль транскрипции этих генов осуществляется в проанализированных клетках за счет других эпигенетических модификаций (возможно, модификаций гистонов).

Обработка вальпроевой кислотой и последующая дифференцировка клеток слюнной железы изменяет метилирование гистона H3 на участках хроматина, ассоциированных с генами, ключевыми для гепатоцитарной дифференцировки

Метилирование гистонов играет одну из наиболее важных ролей в эпигенетической регуляции транскрипции. Мы проанализировали три наиболее изученных типа метилирования гистона H3: H3K4me3, наиболее четко коррелирующего с транскрипционной активностью промоторов; H3K9me3, коррелирующего с инактивацией генов по механизму гетерохроматинизации; H3K27me3, вовлеченного в реализацию инактивирующего действия Polycomb-репрессорных комплексов второго типа (PRC2) на активность генов.

Показано, что характер метилирования гистона H3 на ранних энтодермальных генах *Gata4* и *Gata6* в КСЖ в целом сходен (рис. 5). В КСЖ на первом пассаже молекулы гистона H3, ассоциированные с этими генами, триметилированы по положению H3K9, что говорит об их гетерохроматиновой инактивации. В то же время в КСЖ на обоих генах выявлено триметилирование гистона H3 в положении H3K4. Низкий уровень экспрессии *Gata4* и *Gata6* в КСЖ, обнаруженный ранее методом глубокого секвенирования транскриптома [18], свидетельствует о том, что инактивирующая модификация H3K9me3 гистона H3 в этих клетках является доминантной. В ПКП уровень модификации H3K9me3 гистона H3 на генах *Gata4* и *Gata6* гораздо ниже, а модификация H3K27me3 практически отсутствует. Это коррелирует с относительно высокой экспрессией этих генов в прогениторных клетках печени, что показано ранее методом глубокого секвенирования транскриптома. В КСЖ-диф-VPА значительно снижается метилирование гистона H3 в положении H3K9me3 на генах *Gata4* и *Gata6*, при том что несколько увеличивается метилирование в положении H3K27me3. Это может свидетельствовать об активации транскрипции данных генов после дифференцировки и возможной их вторичной инактивации.

В КСЖ на первом пассаже выявлена сильная инактивация гена транскрипционного фактора *Hnf-*

1a по механизму гетерохроматинизации, а также повышение уровня H3K27me3-модификации гистона H3 на этом гене по сравнению с ПКП. После дифференцировки модификации H3K9me3 и H3K27me3 практически полностью исчезают. Метилирование H3K4me3 гистона H3 на гене *Hnf-1a* в КСЖ-диф-VPА соответствует уровню, характерному для ПКП на первом пассаже. Это может свидетельствовать об активации транскрипции данного гена после проведения гепатоцитарной дифференцировки.

Гены ядерных факторов гепатоцитов *Hnf-3β* и *Hnf-4a* характеризуются сходными особенностями метилирования гистонов. В КСЖ на первом пассаже молекулы гистона H3, ассоциированные с данными генами, метилированы по положениям H3K9me3 и H3K27me3, однако уровень H3K9me3-метилирования гена *Hnf-3β* несколько ниже, чем в ПКП. Эти данные коррелируют с результатами, полученными методами ПЦР-РВ и глубокого секвенирования транскриптома, согласно которым в КСЖ на первом пассаже экспрессируется *Hnf-3β*. В случае гена *Hnf-4a* уровень метилирования H3K9me3 соответствует уровню в ПКП. Однако уровень метилирования H3K27me3 в КСЖ на первом пассаже значительно выше, чем в ПКП. После дифференцировки метилирование H3K9me3 на генах *Hnf-3β* и *Hnf-4a* практически исчезает, а метилирование H3K27me3 сохраняется на низком уровне. Это может свидетельствовать об активации данных генов, что коррелирует с результатами ПЦР-РВ, согласно которым уровень экспрессии *Hnf-3β* в КСЖ-диф-VPА возрастает в 3 раза по сравнению с начальным значением.

Для *Hnf-6* в КСЖ характерен высокий уровень метилирования H3K9me3. После дифференцировки метилирование существенно уменьшается, однако уровень H3K27me3 немного возрастает. Это может свидетельствовать о вторичной инактивации гена *Hnf-6*.

Для гена *Alb* в КСЖ на первом пассаже характерно H3K9me3- и H3K27me3-метилирование гистона H3. После дифференцировки метилирование H3K9me3 практически исчезает, а уровень метилирования H3K27me3 немного снижается по сравнению с начальным значением. Уровень метилирования H3K4me3 в КСЖ-диф-VPА соответствует уровню в ПКП на первом пассаже. Это может свидетельствовать о некоторой активации транскрипции данного гена. По результатам ПЦР-РВ начальный уровень экспрессии *Alb* в КСЖ на первом пассаже незначителен. После дифференцировки уровень экспрессии *Alb* увеличивается почти в 18 раз, однако абсолютное значение экспрессии данного гена в КСЖ-диф-VPА остается довольно низким.

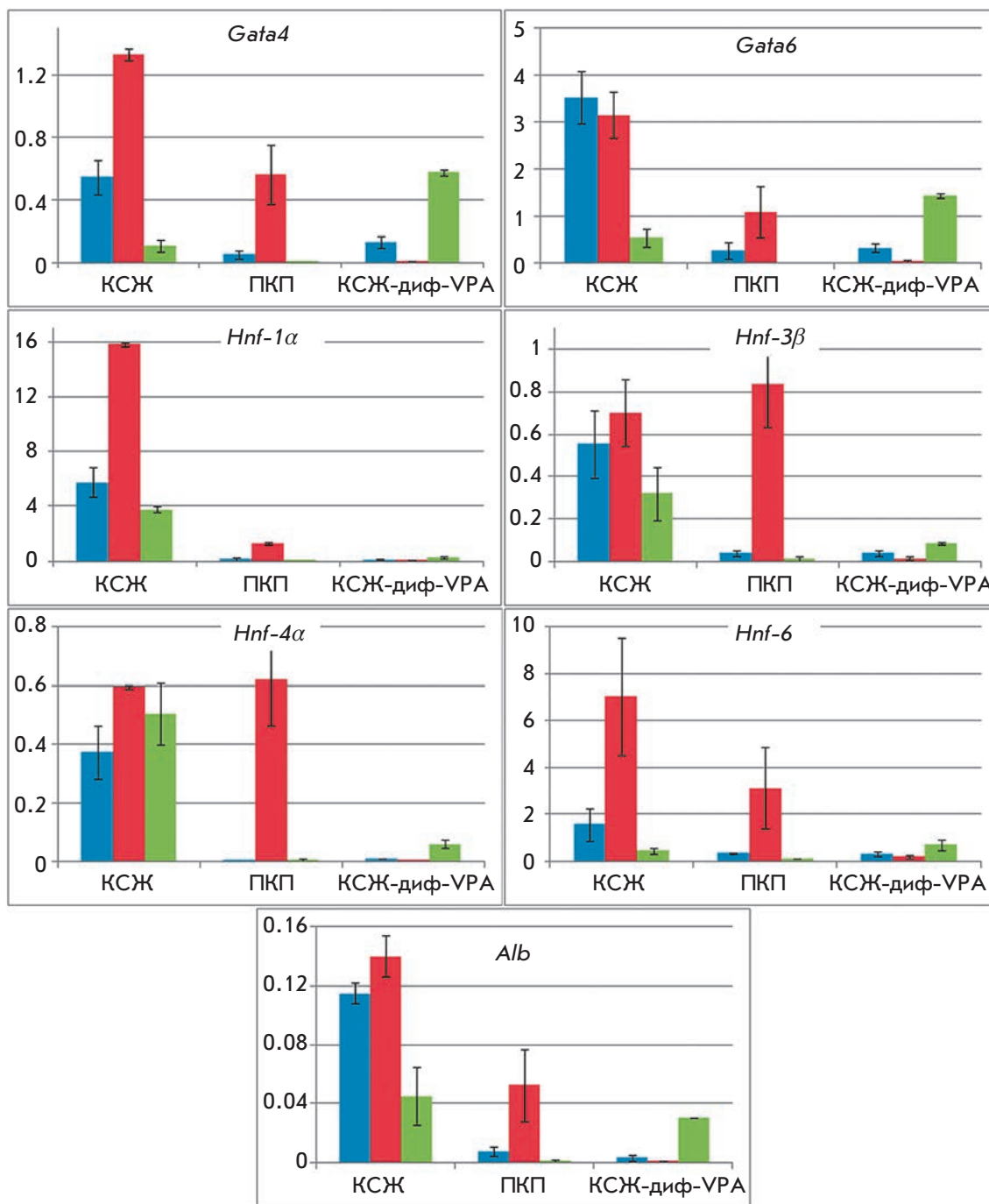


Рис. 5. Анализ метилирования гистона H3 в культурах клеток на первом пассаже. Синим цветом показано метилирование гистона H3 по положению H3K4me3, красным – H3K9me3, зеленым – H3K27me3

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка УРА и последующая процедура дифференцировки затрагивают механизмы эпигенетической регуляции генома. Метилирование ДНК промоторных областей генов в изучаемых клетках различается очень мало. Однако характер метилирования молекул гистона H3, ассоциированного с изученными генами, суще-

ственно различается. Гены ранних маркеров энтодермы *Gata4* и *Gata6* и ядерных гепатоцитарных факторов *Hnf-1α* и *Hnf-6* в КСЖ на первом пассаже инактивированы по механизму гетерохроматинизации. Гены *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Alb*, помимо этого, по-видимому, могут подвергаться действию Polycomb-репрессорного комплекса второго типа. После дифференцировки в КСЖ практически во всех

случаях исчезает H3K9me3-метилирование гистона H3. Однако гены *Gata4*, *Gata6*, *Hnf-6* и *Alb* могут, вероятно, подвергаться вторичной инактивации посредством метилирования H3K27me3. В целом, выявлено хорошее соответствие результатов анализа метилирования гистонов и экспрессии генов.

Вальпроевая кислота увеличивает секрецию мочевины клетками слюнной железы мыши в 3D-условиях культивирования

Одна из детоксикационных функций печени – синтез мочевины из аммиака, осуществляемый гепатоцитами. Способность синтезировать мочевины широко используется в качестве теста на функциональную активность клеток при гепатоцитарной дифференцировке [25]. Для оценки степени гепатоцитарной дифференцировки *in vitro* определили уровень синтеза мочевины дифференцированными КСЖ в 3D-условиях (в коллагеновом геле). В качестве контроля использовали ПКП и КСЖ на первом пассаже, не подвергавшиеся дифференцировке.

На первом пассаже в 2D-условиях КСЖ и ПКП практически не синтезируют мочевины, но приобретают способность синтезировать ее в 3D-условиях культивирования. Увеличение уровня синтеза мочевины клетками в коллагеновом геле в течение всего периода наблюдения говорит о том, что 3D-условия культивирования способствуют дифференцировке данных клеток.

К 15-му дню инкубации КСЖ в геле уровень синтеза ими мочевины достигает 24 мМ на 1×10^6 клеток за 24 ч (рис. 6), тогда как свежeweделенные гепатоциты мыши синтезируют около 350 мМ мочевины

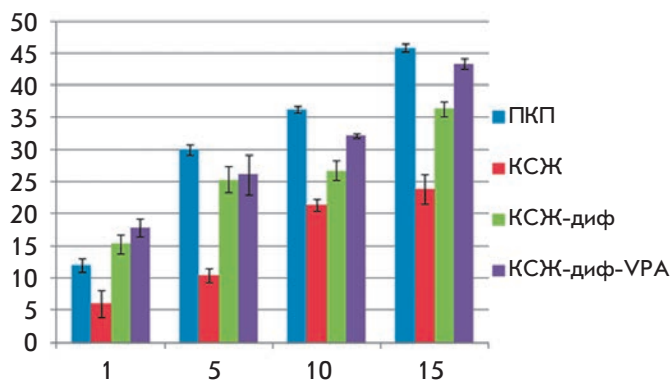


Рис. 6. Секреция мочевины дифференцированными КСЖ в сравнении с КСЖ и ПКП на первом пассаже в 3D-условиях. По оси X – время культивирования клеток в геле (сут), по оси Y – концентрация мочевины в среде культивирования (мМ на 1×10^6 клеток за 24 ч)

на 1×10^6 клеток за 24 ч. Высокий уровень синтеза мочевины КСЖ может отражать их значительную способность к дифференцировке в гепатоцитарном направлении при определенных условиях культивирования. ПКП активнее синтезируют мочевины в 3D-условиях: к 15-му дню уровень синтеза мочевины ПКП в 7.6 раза меньше, чем у первичной культуры гепатоцитов. Это говорит о высокой степени дифференцировки контрольных ПКП в гепатоцитарном направлении в 3D-условиях.

После гепатоцитарной дифференцировки способность КСЖ синтезировать мочевины возрастает, причем при использовании VPA КСЖ синтезируют мочевины на сопоставимом с контрольными ПКП уровне. Таким образом, использованный протокол гепатоцитарной дифференцировки затрагивает не только регуляторные гены КСЖ мыши, но влияет также на их функциональные характеристики. Гепатоцитарная дифференцировка КСЖ позволяет получить клетки, способные к выполнению некоторых функций гепатоцитов. VPA может повысить эффективность дифференцировки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование малых молекул, способных влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и вызывать увеличение эффективности дифференцировки, является перспективным подходом в клеточной биологии. VPA повышает эффективность дифференцировки различных типов клеток. Dong и соавт. [9] показали, что после воздействия VPA значительно увеличивается эффективность гепатоцитарной дифференцировки ES-клеток мыши и уменьшается степень их спонтанной дифференцировки в структуры, напоминающие клетки желчных протоков. Предполагается, что одним из механизмов, ускоряющих дифференцировку ES-клеток, может быть переход клеточного цикла в фазы G0/G1, который происходит при воздействии VPA. Замедление клеточного цикла способствует утрате плюрипотентности и дифференцировке ES-клеток.

VPA также может увеличивать эффективность дифференцировки детерминированных клеток. После 72 ч воздействия 5 мМ VPA на клетки костного мозга человека увеличивается ацетилирование гистонов H3 и H4, что способствует деметилированию ДНК данных клеток [10]. При последующей дифференцировке в гепатоцитарном направлении клетки костного мозга человека экспрессировали альбумин и запасали гликоген более эффективно, чем клетки, не подвергнутые воздействию VPA. Дифференцированные клетки костного мозга были способны к секреции мочевины, причем после обработки VPA синтез мочевины возрастал примерно

в 1.5 раза [10]. Предполагается, что увеличение эффективности дифференцировки клеток костного мозга связано с деметилированием генов, участвующих в гепатоцитарной дифференцировке.

Помимо ингибирования гистон-деацетилаз, VPA способна вызывать активное деметилирование ДНК, не зависящим от репликации способом [7]. Этот эффект также может увеличивать транскрипционную активность генов. Кроме того, VPA активирует гены семейства *Wnt* [26]. Показано, что сигнальный путь *Wnt/β-катенин* необходим для формирования энтодермы и дифференцировки клеток печени и поджелудочной железы [27, 28].

Проведенное нами сравнительное исследование КСЖ и ПКП мыши дает представление о способности КСЖ к гепатоцитарной дифференцировке и о влиянии VPA на эффективность дифференцировки. Показано, что инициация и начальные этапы гепатоцитарной дифференцировки КСЖ проходят достаточно эффективно, затрагивая как широкий набор транскрипционных факторов, так и различные маркеры, характерные для клеток печени. Однако в 2D-условиях культивирования довольно сложно добиться терминальных дифференцировочных стадий. По этой причине эффективность дифференцировки мы оценивали в 3D-условиях культивирования, которые приближают клетки к условиям, в которых они находятся в организме. Культивирование клеток в коллагеновом геле способствует проявлению их морфогенетического и дифференцировочного потенциала [29, 30]. В 3D-условиях культивирования КСЖ-диф-VPA секретируют мочевины на высоком уровне, сопоставимом с контрольными ПКП. Это говорит об эффективной гепатоцитарной дифференцировке, влияющей на функциональные характеристики клеток.

Использованный протокол дифференцировки практически не влияет на метилирование ДНК промоторных областей ключевых для гепатоцитарной дифференцировки генов, что не удивительно, учитывая консервативный механизм метилирования ДНК. Однако обработка VPA и последующая дифференцировка в значительной степени влияют на метилирование гистона H3. Показано, что метилирование гистонов в большинстве случаев выше в контрольных КСЖ и, как правило, ниже в дифференцированных КСЖ. В целом, это можно объяснить прогениторной природой КСЖ: многие гены в прогениторных клетках имеют бивалентную конфигурацию, т.е. обо-

гащены и активирующими, и ингибирующими модификациями гистонов. Это позволяет им дифференцироваться в разных направлениях. Выявлена хорошая корреляция между метилированием гистонов в КСЖ и экспрессией генов.

Скорее всего, существует несколько путей воздействия VPA на дифференцировочный потенциал клеток. Эффективность дифференцировки зависит не только от приобретения ими маркеров целевых клеток, но и от потери дифференцировочных свойств исходной клеточной линии. Как известно из опыта перепрограммирования клеток, детерминированные клетки легче приобретают дифференцировочные маркеры целевых клеток, а потеря маркеров исходных клеток происходит медленнее [31]. Согласно полученным нами данным, VPA способна уменьшать экспрессию ряда маркеров, характерных для исходных КСЖ. Возможно, одним из механизмов воздействия VPA на эффективность дифференцировки является способность к стиранию эпигенетической программы исходной клеточной линии, что ускоряет дифференцировку. Помимо этого, вероятным механизмом влияния VPA на эффективность дифференцировки может быть модификация гистона H3 генов-мишеней и увеличение доступности этих генов для факторов роста и цитокинов, используемых в дифференцировочном протоколе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что клетки поднижнечелюстной слюнной железы мыши проявляют значительную фенотипическую пластичность и способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении. Вальпроевая кислота влияет на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов посредством модификации гистонов, она способна увеличивать специфичность и эффективность гепатоцитарной дифференцировки клеток слюнной железы мыши. Механизм воздействия вальпроевой кислоты на эффективность дифференцировки может заключаться в стирании коммитирования исходной клеточной линии и/или облегчении доступности целевых генов для факторов роста и цитокинов, используемых в процессе дифференцировки. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-50-00029).*

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Праймеры к генам, использованные для проведения ПЦР-РВ

Ген	Расшифровка названия гена	Праймер, нуклеотидная последовательность	Размер ампликона, п.н.	Температура плавления, °С
Контроль				
<i>Gapdh</i>	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	62.6 62.6
Гепатоцитарные маркеры				
<i>Aat</i>	Альфа-1-антитрипсин	CTCGTCCGCTCACTAAACAAG GCTGTCTGAGAGTCAAGGTCTT	248	60.7 61.3
<i>Afp</i>	Альфа-фетопротеин	CCATCACSTTTACCCAGTTTGT CCCATCGCCAGAGTTTTTCTT	101	60.2 60.6
<i>Alb</i>	Альбумин	TGCTTTTTCCAGGGGTGTGTT TTACTTCCTGCACTAATTTGGCA	167	62.4 60.2
<i>Krt19</i>	Цитокератин 19	GGGGGTTCAGTACGCATTGG GAGGACGAGGTCACGAAGC	113	62.9 62.1
<i>Cyp7a1</i>	Цитохром P450 семейство 7, под-семейство а, полипептид 1	AACGGGTTGATTCCATACCTGG GTGGACATATTTCCCCATCAGTT	126	62.0 60.0
<i>Cyp3a13</i>	Цитохром P450 семейство 3, под-семейство а, полипептид 13	GATTCTTGCTTACCAGAAGGGC GCCGGTTTGTGAAGGTAGAGTA	170	61.0 61.7
<i>G6p</i>	Глюкозо-6-фосфатаза	CGACTCGCTATCTCCAAGTGA GGGCGTTGTCCAAACAGAAT	208	61.0 60.9
<i>Perck</i>	Фосфоенолпируват карбоксикиназа 1	TGACAGACTCGCCCTATGTG CCCAGTTGTTGACCAAAGGC	153	61.0 61.4
<i>Tat</i>	Тирозинаминотрансфераза	AGCCGAATCCGAACAAAACC GCCGATAGATGGGGCATAGC	146	60.9 61.3
<i>Tdo</i>	Триптофан 2,3-диоксигеназа	AATCCATGACGAGCACCTATTCA TCACSTTGAGCATGTTCTCT	140	61.4 60.8
Транскрипционные факторы, необходимые для гепатоцитарной дифференцировки				
<i>Hhex1</i>	Гемопозитический гомеобокс	CGAGACTCAGAAATACCTCTCCC CTGTCCAACGCATCSTTTTTTG	162	61.2 60.0
<i>Hnf-3α</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 3α (Foxa1)	GGAGTTGAAGTCTCCAGCGTC GGGGTGATTAAGGAGTAGTGGG	157	62.4 61.7
<i>Hnf-3β</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 3β (Foxa2)	TCCGACTGGAGCAGCTACTAC GCGCCACATAGGATGACA	176	62.8 61.8
<i>Hnf-4α</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 4α	ATGCGACTCTCTAAAACCSTTG ACSTTCAGATGGGGACGTGT	135	60.0 62.7
<i>Hnf-6</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 6	GCCCTGGAGCAAACCTCAAGT TTGGACGGACGCTTATTTTCC	231	62.4 60.6
<i>Tbx3</i>	T-бокс транскрипционный фактор 3	TGGAACCCGAAGAAGACGTAG TACCCCGCTTGTGAAACTGG	84	61.2 62.1
Маркер ацинарных клеток				
<i>Ptf1a</i>	Панкреатический транскрипционный фактор 1 субъединица альфа	GCTACACGAATACTGCTACCG CGCAGCAATAGCTGACGTTG	134	60.3 62.0

Таблица 2. Праймеры для бисульфитного секвенирования

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура плавления, °С	Размер ампликона, п.н.
<i>Alb</i>	<i>AlbF1</i>	TTGGTAAAGATGGTATGATTTTG	58.4	397
	<i>AlbF2</i>	ATTTTGTAATGGGGTAGGAAT	58.7	381
	<i>AlbR</i>	ACCACCTAAAAATTCTCAA	57.3	
<i>Hnf-3β</i>	<i>Hnf-3βF</i>	AATGTGTATTTAAAAGGGAGGAAA	60.0	
	<i>Hnf-3βR1</i>	CCRAACAACCCATTTAAATAATC	59.2	378
	<i>Hnf-3βR2</i>	CCCAAAAACCTAAAATCAA	57.9	180
<i>Gata4</i>	<i>Gata4F1</i>	TATTGAGAGTAGGGAGGAAAGA	60.0	261
	<i>Gata4F2</i>	AGGAAAGAGAAGGAGAATAAATA	58.8	247
	<i>Gata4R</i>	CTAACTAACCTAAAAAATCAC	57.2	
<i>Gata6</i>	<i>Gata6F1</i>	ATTTAGTAGTTTGTAGAGAGTAG	57.1	405
	<i>Gata6F2</i>	TTTTYGATTTATAGTTTGGTATTTT	57.5	381
	<i>Gata6R</i>	AATCCCTACAATCTTCTAAA	55.7	
<i>Hnf-1α</i>	<i>Hnf-1αF1</i>	ATAGGGGTTTTTTTTTTTTTTGGG	62.3	373
	<i>Hnf-1αF2</i>	GGGTGTAGTGATTTATTTTA	55.3	325
	<i>Hnf-1αR</i>	ACTTTAAACTTCAACCTTAC	56.7	
<i>Hnf-4α</i>	<i>Hnf-4αF</i>	TTTGGTTTTTATAGGTATTAGGT	58.9	
	<i>Hnf-4αR1</i>	CTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTC	59.2	399
	<i>Hnf-4αR2</i>	CTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTC	60.8	365
<i>Hnf-6</i>	<i>Hnf-6F</i>	TTTTTTYGGTTTATTTGTGTTGG	60.1	
	<i>Hnf-6R1</i>	ATATCTTACCTTCTCTCTTACT	56.8	390
	<i>Hnf-6R2</i>	TTCCCTCTATCTTTTTTTTTTTC	60.6	363

Таблица 3. Праймеры для анализа метилирования гистонов

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
<i>Alb</i>	<i>AlbF</i>	GGGGTAGGAACCAATGAAATG
	<i>AlbR</i>	GAGGAGGAGGAGAAAGGTTA
<i>Hnf-3β</i>	<i>Hnf-3βF</i>	CACCTGCTTGTGTTTTTGAC
	<i>Hnf-3βR</i>	AGTCCCTTCCTTTACGTCCA
<i>Gata4</i>	<i>Gata4F</i>	TTGGGGGAGCTTTGGGAAGA
	<i>Gata4R</i>	GGAAAAGAGCAGGGACTCGG
<i>Gata6</i>	<i>Gata6F</i>	TACCACCACCACCATCACCAT
	<i>Gata6R</i>	TCTGATCTTTACCTGTGCTG
<i>Hnf-1α</i>	<i>Hnf-1αF</i>	TGATGTTGGGCTAGGACTGA
	<i>Hnf-1αR</i>	CAATTGGGAGTGAGCAGAAG
<i>Hnf-4α</i>	<i>Hnf-4αF</i>	AGACAGGGTGGATAGATAGC
	<i>Hnf-4αR</i>	GACAGTGTGAGTATGTGTGCAG
<i>Hnf-6</i>	<i>Hnf-6F</i>	CCACCACCTACACTACCTTA
	<i>Hnf-6R</i>	GGTTATTCATAGAGGCCAGC

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Snykers S., Henkens T., De Rop E., Vinken M., Fraczek J., De Kock J., De Prins E., Geerts A., Rogiers V., Vanhaecke T. // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. № 1. P. 187–211.
2. Haumaitre C., Lenoir O., Scharfmann R. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. № 20. P. 6373–6383.
3. Vaes B.L., Lute C., van der Woning S.P., Piek E., Vermeer J., Blom H.J., Mathers J.C., Müller M., de Groot L.C., Steegenga W.T. // *Bone.* 2010. V. 46. № 2. P. 514–523.
4. Jeong S.G., Ohn T., Kim S.H., Cho G.W. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 554. P. 22–27.
5. Mike A.K., Koenig X., Koley M., Heher P., Wahl G., Rubi L., Schnürch M., Mihovilovic M.D., Weitzer G., Hilber K. // *Cell Physiol. Biochem.* 2014. V. 33. № 1. P. 205–221.
6. Perucca E. // *CNS Drugs.* 2002. V. 16. P. 695–714.
7. Detich N., Bovenzi V., Szyf M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 30. P. 27586–27592.
8. Liu J., Liu Y., Wang H., Hao H., Han Q., Shen J., Shi J., Li C., Mu Y., Han W. // *Sci. Rep.* 2013. DOI: 10.1038/srep01185.
9. Dong X.J., Zhang G.R., Zhou Q.J., Pan R.L., Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 15. № 41. P. 5165–5175.
10. Dong X., Pan R., Zhang H., Yang C., Shao J., Xiang L. // *PLoS One.* 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0063405.
11. An S.Y., Han J., Lim H.J., Park S.Y., Kim J.H., Do B.R., Kim J.H. // *Tissue Cell.* 2013. DOI: 10.1016/j.tice.2013.12.006.
12. Shubnikova E.A., Pogodina L.S. // *Ontogenez.* 2000. V. 31. № 6. P. 476–480.
13. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. № 2. P. 191–205.
14. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. DOI: 10.1002/term.1572.
15. Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2003. V. 38. P. 104–113.
16. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2004. V. 39. № 3. P. 667–675.
17. Schwarz S., Rotter N. // *Meth. Mol. Biol.* 2012. V. 879. P. 403–442.
18. Petrakova O.S., Terskikh V.V., EChernioglo E.S., Ashapkin V.V., Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Gvazava I.G., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. // *SpringerPlus.* 2014. DOI: 10.1186/2193-1801-3-183.
19. Petrakova O.S., Gvazava I.G., Ashapkin V.V., Shtratnikova V.Y., Terskikh V.V., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. // *Doklady Biological Sciences.* 2013. V. 453. P. 397–400.
20. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // *Acta Med. Okayama.* 2008. V. 62. № 2. P. 63–68.
21. Yi F., Liu G.H., Izipisia Belmonte J.C. // *Cell Res.* 2012. V. 22. P. 616–619.
22. Grunau C., Schattevoy R., Mache N., Rosenthal A. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 5. P. 1053–1058.
23. Tsuji T., Nagai N. // *Int. J. Dev. Biol.* 1993. V. 37. № 3. P. 497–498.
24. Chi J.G. // *J. Korean Med. Sci.* 1996. V. 11. № 3. P. 203–216.
25. You J., Shin D.S., Patel D., Gao Y., Revzin A. // *Adv. Healthcare Mater.* 2014. V. 3. № 1. P. 126–132.
26. Hrebackova J., Hrabeta J., Eckschlager T. // *Curr. Drug Targets.* 2010. V. 11. № 3. P. 361–379.
27. Zaret K.S., Grompe M. // *Science.* 2008. V. 322. № 5907. P. 1490–1494.
28. Engert S., Burtscher I., Liao W.P., Dulev S., Schotta G., Lickert H. // *Development.* 2013. V. 140. № 15. P. 3128–3138.
29. Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Брагина Е.Е., Терских В.В., Васильев А.В. // *Цитология.* 2011. Т. 53. № 4. С. 325–331.
30. Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Gnedeva K.Y., Moldaver M.V., Yegorov Y.E., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. // *Histochem. Cell Biol.* 2010. V. 133. P. 567–576.
31. Sekiya S., Suzuki A. // *Nature.* 2011. V. 475. № 7356. P. 390–393.

УДК 577.27

Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 для таргетной терапии HER2-положительных опухолей

Е. А. Соколова^{1,2}, О. А. Стрёмовский², Т. А. Здобнова¹, И. В. Балалаева^{1*}, С. М. Деев^{1,2}¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

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

Поступила в редакцию 21.08.2015

РЕФЕРАТ Рекомбинантные иммунотоксины представляются исключительно перспективными соединениями с точки зрения развития таргетного лечения опухолей с определенным молекулярным профилем. В работе исследованы свойства нового рекомбинантного иммунотоксина, специфичного к онкомаркеру HER2, полученного на основе антитела формата scFv и фрагмента PE40 псевдомонадного экзотоксина А (4D5scFv-PE40). Показаны высокая аффинность иммунотоксина к онкомаркеру, избирательность токсического действия в отношении HER2-гиперэкспрессирующих клеток и стабильность иммунотоксина при хранении. Значение IC₅₀ иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении раковых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2, на 2.5–3 порядка ниже, чем в отношении клеток СНО, не экспрессирующих этот онкомаркер, и на 2.5–3 порядка ниже, чем значение IC₅₀ свободного PE40 в отношении раковых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2. Полученные данные позволяют рассчитывать в перспективе на высокие значения терапевтического индекса иммунотоксина 4D5scFv-PE40 при использовании *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онкомаркер HER2, псевдомонадный экзотоксин А, рекомбинантный иммунотоксин, 4D5scFv, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2); scFv – одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (single-chain variable fragment); PE40 – фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (*Pseudomonas* exotoxin A); МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиума бромид.

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс в изучении молекулярных основ канцерогенеза позволил выявить тонкие биохимические отличия опухолевых клеток от нормальных и, таким образом, создал предпосылки для развития методов лечения, опирающихся на эти отличия. Концепция таргетной терапии подразумевает создание препаратов, специфически взаимодействующих с молекулами-мишенями, экспрессирующимися в опухолевых клетках, но не представленными в нормальных тканях. Этот подход позволяет прицельно элиминировать опухолевые клетки с минимальным негативным воздействием на другие ткани и органы.

К таргетным препаратам относят, в первую очередь, моноклональные антитела, специфически взаимодействующие с поверхностными рецепторами-онкомаркерами (включая антиангиогенные антитела) [1, 2] и низкомолекулярные ингибиторы ферментов [3]. Для усиления специфического воз-

действия на опухоль в состав препаратов на основе антител может быть введен дополнительный токсический компонент [4]. Первым таким бифункциональным соединением стал препарат Kadcyla® [5], введенный в клиническую практику для лечения метастатического рака молочной железы в конце 2013 года. Этот препарат представляет собой химический конъюгат полноразмерного гуманизированного антитела, специфичного к онкомаркеру HER2, и токсического соединения, ингибирующего ассоциацию тубулиновых субъединиц при сборке микротрубочек. В случае, когда и направляющий, и эффекторный (токсический) модули представлены белковыми молекулами, принципиально возможным становится объединение их в единую полипептидную цепь методами генной инженерии. Рекомбинантные бифункциональные белки, получившие название иммунотоксинов, представляются исключительно перспективными соединениями с точки зрения даль-

нейшего развития таргетного лечения опухолей благодаря строго контролируемому составу, возможности биотехнологической наработки в бактериальных продуцентах, возможности оптимизации свойств методами генной инженерии и т.п. [6].

В рамках данной работы исследованы физико-химические и функциональные свойства нового HER2-специфичного рекомбинантного иммунотоксина, полученного на основе антитела формата scFv и псевдомонадного экзотоксина А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и характеристика белков

Наработку рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 и свободных полипептидов 4D5scFv и PE40 (ETA) осуществляли в культуре *Escherichia coli* штамма BL21, предварительно трансформированной плазмидами pSD-4D5scFv-PE40, pSD-4D5scFv и pSD-PE40, содержащими гены белков 4D5scFv-PE40, 4D5scFv и PE40 соответственно, под контролем *lac*-промотора. Используемые плазмиды были получены на основе векторов pIG6-4D5 и pIG6-4D5МОСВ-ETA [7, 8].

Очистку белков осуществляли в две стадии методами Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap FF 1 ml (GE Healthcare, США) и ионообменной хроматографии на колонке Q Sepharose FF 1 ml (GE Healthcare, США).

Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу [9].

Константу диссоциации комплекса 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре BIAcore 3000 (GE Healthcare, США) с использованием рекомбинантного внеклеточного

домена рецептора HER2 p185^{HER2-ECD} (Sino Biological, Inc., Китай).

Исследование цитотоксичности

В работе использовали клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3 (номер по каталогу ATCC – HTB-77), характеризующиеся гиперэкспрессией рецептора HER2, и HER2-отрицательные клетки яичника китайского хомячка CHO (ATCC – CCL-61). Для получения флуоресцентной опухолевой линии SKOV-kat клетки SKOV-3 были трансфицированы геном красного флуоресцентного белка TurboFP635 с использованием вектора pTurboFP635-C (Evrogen, Россия) [10].

Клетки выращивали в среде RPMI-1640 (HyClone, США) с 10% эмбриональной сывороткой теленка (HyClone, США) и 2 mM глутамином («ПанЭко», Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ цитотоксичности исследуемых белков проводили с помощью стандартного МТТ-теста [11]. При этом обработку клеток проводили по двум схемам. Для оценки эффекта краткосрочного воздействия клетки инкубировали в присутствии исследуемых белков в течение 40 мин при 4°C. Затем несвязавшиеся белки отмывали, к клеткам добавляли ростовую среду и выращивали в течение 48 ч. В случае анализа эффекта длительного воздействия клетки выращивали в присутствии в среде исследуемых белков в течение 72 ч.

Расчет среднего значения и 95%-доверительного интервала для концентрации белка, приводящей к снижению жизнеспособности культуры в 2 раза (IC₅₀), проводили в программе GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый иммунотоксин 4D5scFv-PE40 представляет собой единую полипептидную цепь, объединяющую направляющий и токсический модули (рис. 1).



Рис. 1. Схема рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40. Показаны участки, кодирующие: ompA, белый – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию целевого рекомбинантного белка в периплазматическое пространство; His₆, зеленый – олигогистидиновый пептид; 4D5scFv, голубой – анти-HER2-антитело 4D5scFv; H, серый – гибкий гидрофильный линкер из шарнирной области мышиного IgG (16 а.о.); PE40, сиреневый – фрагмент природного экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa* (домены II, Ib и III); K, оранжевый – олигопептид KDEL

Рекомбинантный белок 4D5scFv-PE40 содержит фрагмент PE40 экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa* с молекулярной массой 40 кДа без природного рецепторузнающего домена. Фрагмент PE40 присоединен к С-концу анти-HER2-антитела формата scFv (4D5scFv) через гибкий гидрофильный 16-аминокислотный линкер [12]. Благодаря этому линкеру расстояние между соединяемыми им участками белковой молекулы, 4D5scFv и PE40, составляет 2.5–2.7 нм, что позволяет двум доменам белка не испытывать стерических затруднений и сохранять свои функциональные свойства. Антитело 4D5scFv представляет собой рекомбинантный полипептид на основе слитых варибельных доменов легкой и тяжелой цепей полноразмерного антитела 4D5, специфичного к онкомаркеру HER2. Антитело 4D5scFv зарекомендовало себя как эффективный направляющий агент при создании бифункциональных цитотоксических белков [13–18].

На С-конце молекула иммунотоксина содержит олигопептид KDEL – сигнал транслокации в эндоплазматический ретикулум. Олигогистидиновые последовательности включены на оба конца целевого белка для его очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Сигнальный пептид отpA обеспечивает секрецию целевого рекомбинантного белка в периплазматическое пространство как для снижения его токсического действия на клетку, так и для повышения уровня растворимой фракции целевого белка при биотехнологической наработке в бактериальных продуцентах [19].

Использование для очистки рекомбинантного белка последовательно методов металл-хелатной и ионообменной хроматографии позволило получить иммунотоксин 4D5scFv-PE40 (M_r 71 кДа) с чистотой более 96%, стабильность которого подтверждена при хранении в течение 3 мес. при +4°C, что может рассматриваться как очень хороший показатель для белковых препаратов. В течение этого времени показано также сохранение гомогенности и высокой аффинности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 к внеклеточному домену рецептора HER2 (K_d ~7 нМ). Для сравнения, K_d свободного антитела 4D5scFv, определенная тем же методом плазмонного резонанса, составляет 5.2 нМ [20].

Исследование функциональных свойств 4D5scFv-PE40 было проведено на линии клеток SKOV-kat [10], полученной путем трансфекции клеток родительской линии SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека), характеризующейся гиперэкспрессией онкомаркера HER2, геном красного флуоресцентного белка TurboFP635. С учетом возможного влияния процедуры трансфекции на клетки особое внимание было уделено сохранению их морфологии и феноти-

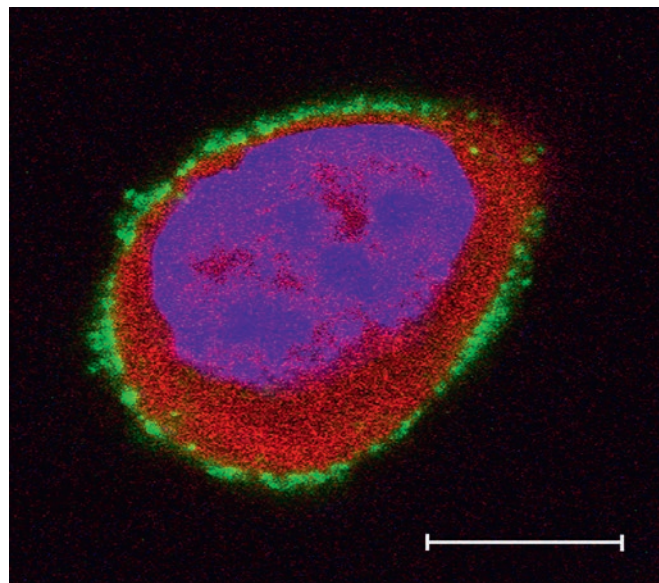


Рис. 2. Клетка линии SKOV-kat, экспрессирующая красный флуоресцентный белок TurboFP635 (красный). Ядро клетки окрашено Hoechst 33342 (синий). Экспрессия рецептора HER2 на поверхности клетки подтверждена окрашиванием комплексами квантовых точек с анти-HER2-антителом 4D5scFv [21] (зеленый). Масштаб – 10 мкм

па. Предварительно методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием HER2-направленных комплексов полупроводниковых квантовых точек [21] было подтверждено сохранение гиперэкспрессии рецептора HER2 на поверхности трансфицированных клеток (рис. 2).

Анализ цитотоксичности 4D5scFv-PE40 в условиях короткой (40 мин) инкубации на холоде продемонстрировал высокоизбирательное токсическое действие в отношении клеток SKOV-kat (таблица). Поскольку данные условия препятствуют интернализации белков, очевидно, что именно специфическое связывание с рецептором HER2 и удержание на мембране оказывают влияние на метаболизм клеток при их последующем культивировании после удаления иммунотоксина из среды.

В условиях организма характерно длительное присутствие лекарственного препарата в крови и особенно в межклеточном матриксе. В опытах *in vitro* было показано, что селективность цитотоксического действия 4D5scFv-PE40 на клетки SKOV-kat сохраняется даже при 72-часовом присутствии препарата в ростовой среде. Концентрация 4D5scFv-PE40, приводящая к двукратному снижению жизнеспособности культуры клеток SKOV-kat (IC_{50}),

Цитотоксичность белков 4D5scFv-PE40, PE40 и 4D5scFv

Клеточная линия	IC ₅₀ , нМ*					
	Кратковременное воздействие (40 мин)			Длительное воздействие (72 ч)		
	4D5scFv- PE40	PE40	4D5scFv	4D5scFv- PE40	PE40	4D5scFv
CHO	> 1000	>1000	> 1000	8.7 (5.6–13.6)	2.9 (1.8–4.6)	> 100
SKOV-kat	22** (5.7–85.3)	> 1000	> 1000	0.008** (0.006–0.013)	4.9 (1.3–18.4)	> 100
SKOV-3	–	–	–	0.017** (0.011–0.025)	6.6 (3.1–14.0)	> 100

*Указано среднее значение и 95% доверительный интервал.
**Статистически значимое отличие от CHO.

на 3 порядка ниже IC₅₀ 4D5scFv-PE40 в отношении клеток CHO, не экспрессирующих рецептор HER2. Необходимо отметить проявление токсического действия и самого PE40 в этих условиях, однако IC₅₀ полипептида PE40 в отношении клеток SKOV-3 и SKOV-kat также превышает IC₅₀ иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на 2.5–3 порядка. Полученные результаты позволяют рассчитывать в перспективе на высокие значения терапевтического индекса данного иммунотоксина при использовании *in vivo*.

Хорошо известна устойчивость SKOV-3, исходной линии для получения SKOV-kat, к действию цитотоксических агентов [22]. Тем не менее токсичность 4D5scFv-PE40 в отношении SKOV-3 также проявлялась в пиколярном диапазоне концентраций и несущественно отличалась от таковой для SKOV-kat (таблица).

Флуоресцирующие опухолевые клеточные линии являются уникальным по своим возможностям инструментом исследований. Благодаря экспрессии флуоресцентного белка опухолевыми клетками SKOV-kat продолжение исследований созданного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на экспериментальных опухолевых моделях на основе этих клеток становится возможным с применением высокоинформативных методов прижизненной оптической визуализации на уровне целого организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи первых таргетных противоопухолевых препаратов принципиально изменили подход к разработке новых средств противоопухолевой терапии и привели к изменению стандартов лечения многих видов онкологических заболеваний. Наибольший успех достигнут в онкогематологии и лечении диссеминированных опухолей, однако и в случае лечения солидных опухолей определенного молекулярного профиля показано преимущество таргетного подхода.

Исследованный в работе иммунотоксин 4D5scFv-PE40 предназначен для таргетной терапии опухолей, экспрессирующих онкомаркер HER2. Специфичность данного иммунотоксина идентична таковой известного противоопухолевого препарата Герцептин®. В то же время наличие токсического модуля в составе 4D5scFv-PE40 многократно увеличивает специфическую токсичность данного белка в отношении HER2-экспрессирующих клеток и позволяет рассчитывать на его эффективность в ходе последующих исследований терапевтического потенциала в экспериментах *in vivo*. ●

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (проект RFMEFI57814X0051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84 (1). P. 1–26.
2. Hojjat-Farsangi M. // Tumour Biol. 2015. V. 36. P. 543–556.
3. Roskoski R., Jr. // Pharmacol. Res. 2015. V. 100. P. 1–23.

4. Weiner G.J. // Nat. Rev. Cancer. 2015. V. 15. Issue 6. P. 361–370.
5. Lambert J.M., Chari R.V. // J. Med. Chem. 2014. V. 57. P. 6949–6964.
6. Alewine C., Hassan R., Pastan I. // Oncologist. 2015. V. 20. № 2. P. 176–185.

7. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1486–1492.
8. Di Paolo C., Willuda J., Kubetzko S., Lauffer I., Tschudi D., Waibel R., Plückthun A., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2837–2848.
9. Laemmli U.K., Beguin F., Gujer-Kellenberger G. // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 47. P. 69–85.
10. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget.* 2015. DOI: 0.18632/oncotarget.5130.
11. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
12. Muller K.M., Arndt K.M., Strittmatter W., Pluckthun A. // *FEBS Lett.* 1998. V. 422. P. 259–264.
13. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e2434.
14. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Invest. New Drugs.* 2011. V. 29. Issue 1. P. 22–32.
15. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 9221–9225.
16. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. P. 831–840.
17. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. // *Oncogene.* 2014. V. 33. P. 429–439.
18. Zhang M., Qiu Z., Li Y., Yang Y., Zhang Q., Xiang Q., Su Z., Huang Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 3913–3923.
19. Pines O., Inouye M. // *Mol. Biotechnol.* 1999. V. 12. P. 25–34.
20. Соколова Е.А., Здобнова Т.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. Вып. 12. С. 1682–1688. (Sokolova E.A., Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2014. V. 79. Issue 12. P. 1376–1381.)
21. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics.* 2012. V. 5. № 11–12. P. 860–867.
22. Morimoto H., Safrit J.T., Bonavida B. // *J. Immunol.* 1991. V. 147. P. 2609–2616.

УДК 577

Модельная система в клетках S2 для тестирования функциональной активности инсуляторов дрозофилы

М. В. Тихонов, Н. Б. Гасанов, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко*

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

*E-mail: mog@genebiology.ru

Поступила в редакцию 19.03.2015

РЕФЕРАТ Инсуляторы – особый класс регуляторных элементов, способных участвовать в установлении взаимодействий между энхансерами и промоторами в геноме высших эукариот. Механизмы действия инсуляторов не выяснены, что во многом связано с отсутствием удобных модельных систем. Нами продолжено изучение модельной системы, основанной на транзientной экспрессии плазмиды, содержащей энхансер мобильного элемента *scoria*, в культурах эмбриональных клеток дрозофилы. Показано, что при транзientной трансфекции кольцевых плазмид входящий в их состав наиболее хорошо изученный инсулятор дрозофилы, найденный в мобильном элементе МДГ4, проявляет при блокировании энхансеров такие же свойства, как и в стабильных трансгенных линиях дрозофилы. Таким образом, в культуре клеток дрозофилы можно изучать основные свойства инсуляторов, что дает дополнительные возможности для исследования функциональной роли отдельных инсуляторных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инсуляторы, энхансер *scoria*, Su(Hw), транскрипция с энхансера, *hsp70*-промотор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ S2 – культура клеток, полученная из эмбриональных клеток дрозофилы; Sg4 – культура клеток дрозофилы, производная линии S2; *hsp70*-промотор – промотор гена теплового шока 70.

ВВЕДЕНИЕ

В клетках высших эукариот энхансер может активировать промотор на расстоянии, достигающем нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов [1–3]. Изучение инсуляторов может внести значительный вклад в понимание механизмов дальних взаимодействий между регуляторными элементами. Инсуляторами названы регуляторные элементы, способные блокировать взаимодействия между энхансером и промотором, если находятся между ними [4–7]. При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера и промотора, т.е. промотор может быть активирован любым другим энхансером, а энхансер способен активировать любой другой промотор. В последнее время стало очевидным, что многие инсуляторные белки обеспечивают специфичные взаимодействия между удаленными регуляторными элементами и структурными доменами хромосом [1].

В изучении транскрипционных факторов, функционирующих в составе инсуляторов, важную роль играют модельные системы, созданные на основе клеточных линий млекопитающих [8] и дрозофилы [9–11]. Одной из проблем при создании удобной модельной системы для изучения инсуляторов явля-

ется сравнительно небольшое число описанных энхансеров, способных эффективно функционировать в культурах клеток дрозофилы.

Ранее было показано, что энхансер из ретротранспозона *scoria* активирует промотор гена белка теплового шока 70 в клетках S2 *Drosophila melanogaster*, имеющих эмбриональное происхождение [10]. Энхансер, размером 150 п.н., находится непосредственно после 5'-длинного концевого повтора ретротранспозона *scoria* (рис. 1А) и содержит на 3'-конце дупликацию из 28 п.н. [12, 13]. В состав дублированной последовательности входят две копии октануклеотида TTGTGAAA, расположенные в инвертированной ориентации. Три аналогичных октануклеотида находятся в 5'-области энхансера. Известны *scoria*-элементы, содержащие энхансер только с одной последовательностью 28 п.н., которые обладают значительно сниженной транскрипционной активностью. Предполагается, что с последовательностью TTGTGAAA связывается фактор транскрипции, который и определяет активность энхансера. Выделено также несколько транскрипционных факторов, которые преимущественно связываются с 5'-областью энхансера и могут как активировать, так и ингибировать транскрипцию [13–15].

В нашей работе проведено детальное исследование энхансера *coria* в модельной системе, которая используется для тестирования инсуляторов в культуре клеток дрозофилы. Адекватность модельной системы, основанной на транзистентной экспрессии кольцевой плазмиды в культурах клеток дрозофилы, изучали с использованием инсулятора, локализованного в регуляторной области ретротранспозона МДГ4 дрозофилы [4–7]. Ранее с помощью модельных систем, созданных на основе стабильных трансгенных линий дрозофилы, на примере этого инсулятора были описаны основные свойства регуляторных элементов данного класса. В представленной работе показано, что все основные свойства инсулятора МДГ4 воспроизводятся при транзистентной экспрессии кольцевой плазмиды в культуре клеток дрозофилы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание конструкций

В качестве исходных векторов использовали плазмиды pGL3basic и pGL3enhancer (Promega). Промотор (-203...+253 п.н. относительно старта транскрипции) гена *hsp70* амплифицировали с геномной ДНК *D. melanogaster* и встраивали по сайтам рестрикции HindIII, EcoRI в векторы pGL3basic и pGL3enhancer. Энхансер *coria* размером 168 п.н. амплифицировали с геномной ДНК *D. melanogaster* и встраивали ниже сигнала полиаденилирования, в вектор pGL3basic и pGL3enhancer (конструкции *he*) по сайту рестрикции BamHI. Конструкции e_a , e_r получены путем встраивания амплифицированного энхансера *coria* выше кодирующей части гена люциферазы. В конструкциях $e_a h$ и $e_r h$ энхансер *coria* клонировали в вектор *h* выше промотора по сайту рестрикции SmaI. В случае конструкций $g_a e_a h$, $g_r e_a h$, $g_a e_r h$, $g_r e_r h$, $e_a g_a h$, $e_a g_r h$, $g_a e_a g_a h$, $g_r e_a g_a h$, $e_a s_a h$, $e_a s_a g_a h$, $e_a s_a g_r h$, $e_a s_a g_r h$, $e_a g_a s_a h$ сначала отдельно собирали последовательность из регуляторных элементов на основе вектора pBluescript, а затем переносили ее в вектор *h* по сайту рестрикции SmaI выше промотора. Инсулятор *gypsy* (из ретротранспозона МДГ4) – ранее амплифицированный в лаборатории фрагмент из 450 п.н. Сигнал полиаденилирования вируса SV40 был вырезан из вектора pAc5.1hisB (Invitrogen) по сайтам рестрикции BamHI, SalI. В случае конструкций $he_a g_a$, $he_a g_r$, $hgde_a$, $hgde_a g_a$, $hgde_a g_r$, так же собирали совокупность регуляторных элементов в векторе pBluescript и переносили в вектор *h* по сайту рестрикции BamHI после сигнала полиаденилирования. В конструкции $g_a hgde_a$ регуляторные элементы встраивали по сайтам рестрикции SmaI и BamHI – выше и ниже транскрипционной единицы соответственно.

Культивирование клеток, трансфекция

Культуру клеток S2 *Drosophila* выращивали в среде SFX (HyClone) при 25°C. Клетки трансфицировали с помощью реагента Cellfectin II (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя (около 8×10^5 клеток на трансфекцию). За 2 ч до трансфекции клетки разносили по лункам 12-луночного планшета. На одну трансфекцию брали 0.5 мкг ДНК. Во всех случаях проводили котрансфекцию опытных конструкций, в которых в качестве репортерного гена использовали ген люциферазы светлячка, и контрольной конструкции, в которой под контролем промотора гена актина размещали ген люциферазы медузы (в соотношении 19 : 1). Клетки собирали через 48 ч после трансфекции.

Выделение РНК, обратная транскрипция

РНК выделяли из клеток S2 при помощи TRI-реагента (Ambion) согласно рекомендациям производителя. Выделенную суммарную РНК очищали от примеси геномной ДНК с помощью набора реактивов Turbo DNA-free (Ambion). К 1–5 мкг препарата РНК добавляли рассеянную затравку до концентрации 1–5 мкМ, нагревали до 70°C, инкубировали в течение 5 мин и быстро охлаждали во льду. Добавляли dNTP до концентрации 0.5 мМ, буфер для обратной транскриптазы, 5 ед. ингибитора РНКаз SUPERase-In (Ambion), 60 ед. обратной транскриптазы ArrayScript Reverse Transcriptase (Ambion). Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при 42°C, затем ферменты инактивировали, нагревая до 95°C в течение 5 мин.

Количественная ПЦР с получением результатов в режиме реального времени

Количественную ПЦР с получением результатов в режиме реального времени проводили на образцах кДНК. Одновременно проводили как минимум три независимых реакции с каждой парой праймеров для каждого из трех независимо собранных образцов. Относительные количества ДНК определяли методом $\Delta\Delta C_t$. В качестве эндогенного контроля использовали участки генов *γTub37C* и *rpl32*. В работе использовали следующие пары праймеров: *tub* (gctttcccaagaagctcataca и gggtcagtcggtattatccag), *rpl32* (gttcgatccgtaaccgatgt и ccagtcggatcgatgatgctaa), *Fluc* (ttgctccaacaccccaacat и ttccgtgctccaaaaca), *Rluc* (cagtggtggccagatgtaaacaa и taatacaccgcgctactgctca).

Двойной люциферазный анализ

Двойной люциферазный анализ проводили, используя фирменный набор реактивов Firefly & Renilla Luciferase Assay Kit (Biotium), согласно протоколу

производителя. Измерение проводили на планшетном анализаторе с чувствительностью 100 и временем экспозиции 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность энхансера мобильного элемента *coria* зависит от клеточной линии дрозофилы

Ранее было показано [10], что энхансер *coria* (рис. 1А) может более чем в 100 раз усиливать транскрипцию с промотора гена белка теплового шока 70 (*hsp70*) в составе плазмиды, трансфицированной в клетки S2. Однако согласно [16], энхансер *coria* не стимулирует транскрипцию в клетках S2, и его активность выявлена только в клеточной линии DH-33, полученной из *Drosophila hydei*.

Первым вероятным объяснением таких противоречивых результатов было предположение о том, что конструкция, используемая в работе [10], содержала дополнительные регуляторные элементы, которые могли усиливать работу энхансера *coria* в клетках S2. Действительно, экспрессионный вектор содержал три копии энхансера *coria* с 3'-стороны репортерного гена люциферазы светлячка, контролируемого минимальным *hsp70*-промотором (рис. 1Б). Рядом с копиями энхансера *coria* (e_3) находился энхансер SV40 (s), который также мог принимать участие в стимуляции транскрипции [10].

С целью изучения роли сложной организации области энхансеров в стимуляции транскрипции сравнили активность этой конструкции (he_3s) и конструкции, содержащей только промотор (h), в S2-клетках, полученных из двух разных источников (рис. 1Б). Одна линия клеток велась в нашей лаборатории (S2_G), вторая получена непосредственно из фирмы Invitrogen (S2_I). Неожиданно оказалось, что сложный элемент, состоящий из трех энхансеров *coria* и энхансера SV40, не стимулирует *hsp70*-промотор ни в одной из тестируемых линий клеток (рис. 1Б). Таким образом, сложный энхансер не стимулирует транскрипцию в клетках S2.

Полученные результаты можно объяснить различиями в наборе транскрипционных факторов, которые экспрессируются в клеточных линиях S2, культивируемых независимо на протяжении длительного времени. С целью проверки данного предположения создан новый вектор, в котором за репортерным геном была встроена только одна копия энхансера *coria* (рис. 1Б). Мы использовали две дополнительные линии клеток: S2_P (линия, использованная в проекте MODEncode) и Sg4 (получена из лаборатории В. Пирротты, Университет Ратгерса, США). Линия Sg4 – производная линии S2, отличается от S2 профилем экспрессии части генов.

В результате трансфекции контрольной и опытной плазмид в четыре клеточные линии установили, что энхансер *coria* способен примерно в 80–100 раз стимулировать транскрипцию *hsp70*-промотора в линиях S2_P и Sg4, но не обладает стимулирующим потенциалом в двух ранее используемых линиях S2. Таким образом, одна копия энхансера *coria* способна эффективно стимулировать транскрипцию только в определенных вариантах клеток S2.

Энхансер *coria* индуцирует транскрипцию в двух направлениях с эффективностью, сравнимой с базовой активностью промотора *hsp70*

В работе [10] показано, что сложный регуляторный элемент, состоящий из энхансеров SV40 и *coria*, индуцирует двустороннюю транскрипцию. В настоящее время существует достаточно много данных о том, что инициация транскрипции происходит на большей части энхансеров [2, 3]. Наиболее часто с энхансеров транскрибируются короткие нестабильные неполладенилированные транскрипты, которые обычно не транспортируются в цитоплазму и не транслируются. Поэтому решили проверить способность энхансера *coria* индуцировать транскрипцию. Ранее было показано, что некоторые энхансеры могут продуцировать полноценные мРНК [2, 3], поэтому была изучена способность энхансера *coria* продуцировать полиаденилированную РНК, способную транслироваться.

С этой целью получили конструкции, в которых энхансер *coria* был встроен в прямой либо обратной ориентации вместо *hsp70*-промотора выше репортерного гена люциферазы светлячка (рис. 2). В качестве контроля использовали плазмиды с/без *hsp70*-промотора выше репортерного гена. Этими плазмидами трансфицировали клетки Sg4. В результате показали, что с энхансера *coria* в обеих ориентациях запускается транскрипция и экспрессируется люцифераза, но в 5–20 раз слабее, чем в случае конструкции с *hsp70*-промотором. При этом в прямой ориентации энхансер *coria* функционирует в качестве промотора, приблизительно в 3 раза более сильного, чем в обратной ориентации. Таким образом, энхансер *coria* может функционировать как слабый двунаправленный промотор, индуцирующий формирование функциональной мРНК, на матрице которой синтезируется люцифераза. Уровень транскриптов, синтезируемых с энхансера *coria* и *hsp70*-промотора, сравнили с помощью обратной транскрипции РНК с последующей количественной ПЦР. Оказалось, что транскрипция с промотора всего лишь в 2–3 раза эффективней транскрипции с энхансера. Таким образом, одна копия энхансера *coria* может запускать двунаправленный синтез молекул РНК, пригодных

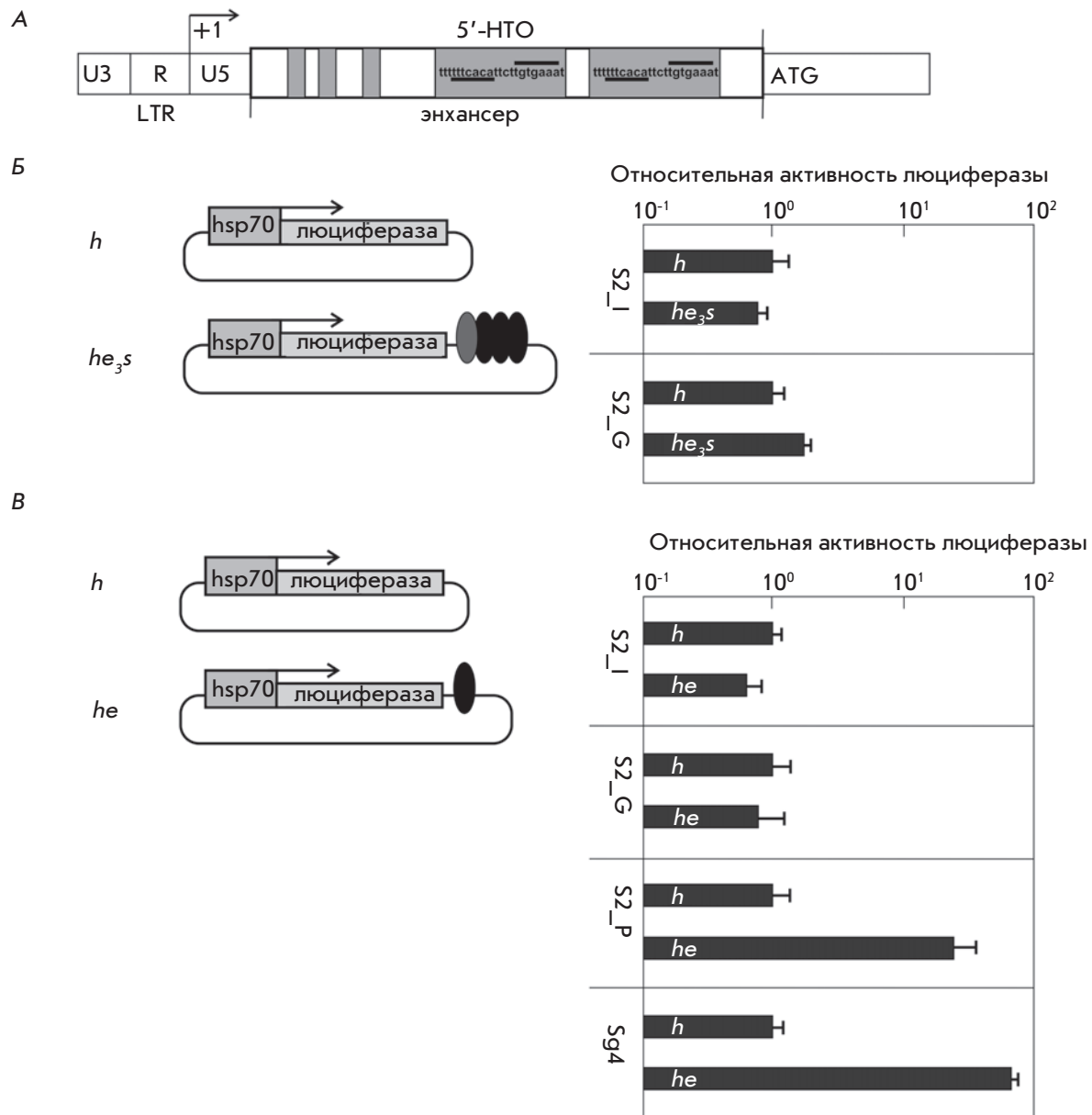


Рис. 1. А – схема энхансера из ретротранспозона *coria*. Энхансер расположен в 5'-нетранспируемой области (5'-НТО). LTR – длинный концевой повтор. +1 – точка начала транскрипции. ATG – стартовый кодон. Серыми прямоугольниками показаны октануклеотидные повторы. Б – результаты анализа активности элемента из трех копий энхансера *coria* (черные овалы) и одной копии энхансера SV40 (серый овал), расположенных с 3'-конца репортерного гена люциферазы светлячка (серый прямоугольник), находящегося под контролем *hsp70*-промотора (серый прямоугольник со стрелкой). Контрольная конструкция *h* и опытная *he_{3s}* трансфицированы в два варианта клеток S2 (S2_I и S2_G). На гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов. В – анализ активности одной копии энхансера *coria* (черный овал), расположенного с 3'-конца репортерного гена люциферазы светлячка. Контрольной конструкцией *h* и опытной *he* трансфицированы четыре варианта клеток S2 (S2_I, S2_G, S2_P, Sg4). На гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

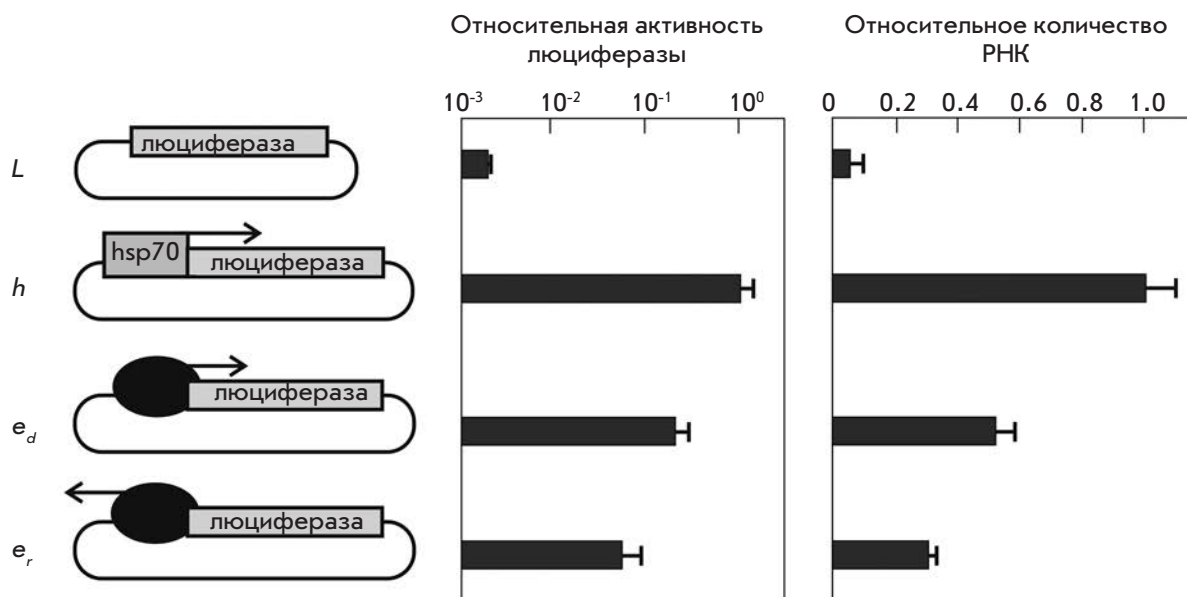


Рис. 2. Результаты анализа промоторной активности энхансера *soria* (черный овал). Стрелка показывает ориентацию энхансера. В качестве контролей использовали плазмиды *L* (отрицательный контроль, без промотора) и *h* (положительный контроль, с промотором *hsp70*). На левой гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов. На правой гистограмме в линейной шкале представлено относительное количество РНК, транскрибируемой с гена люциферазы светлячка. Все данные нормировали относительно уровней экспрессии генов *rpl32*, *tub* и люциферазы медузы. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

для прохождения этапов трансляции, и на уровне, сопоставимом с базовой активностью *hsp70*-промотора.

Инсулятор из ретротранспозона МДГ4 незначительно влияет на активность энхансера *soria* в положении перед промотором

Наиболее сильный инсулятор дрозофилы, состоящий из 12 сайтов связывания белка Su(Hw), локализован в регуляторной области ретротранспозона МДГ4 [17–19]. В трансгенных линиях дрозофилы активность этого инсулятора зависит от взятых в исследование энхансеров и промоторов. Так, одна копия такого инсулятора полностью блокирует активность энхансеров гена *yellow*, но почти не влияет на активность энхансера гена *white* [20, 21]. С помощью трансфекции кольцевой плазмиды в клетки S2 дрозофилы показано [9], что одна копия инсулятора из МДГ4, размещенная перед промотором репортерного гена, снижает в 2 раза активность энхансера *soria*, встроенного с 3'-стороны гена. Двукратное снижение транскрипции можно объяснить влиянием инсулятора как на активность энхансера, так и на промотор, расположенный рядом. Так, белок Su(Hw) детекти-

руется не только на инсуляторе, но также на последовательностях энхансера *soria* и промотора *hsp70* в составе трансфицированных конструкций [22].

Определить, на активность какого элемента влияет инсулятор, мы попытались с помощью серии конструкций, в которых энхансер находился в положении –233 п.н. относительно старта транскрипции с *hsp70*-промотора (рис. 3). Энхансер был размещен в двух ориентациях – прямой (*e_d*) и обратной (*e_r*). В трансфицированных клетках Sg4 уровень экспрессии репортерного гена не зависел от ориентации энхансера. Инсулятор МДГ4 (*g*) располагался непосредственно перед энхансером либо в прямой, либо в обратной ориентации. Таким образом, получены четыре конструкции, в которых инсулятор и энхансер размещались в разных ориентациях друг относительно друга и промотора. Всеми конструкциями трансфицировали клетки Sg4 (рис. 3). Определение уровня экспрессии люциферазы показало, что в конструкциях, в которых энхансер и промотор имели друг относительно друга противоположную ориентацию, присутствие инсулятора в любой ориентации не влияло или незначительно увеличивало уровень

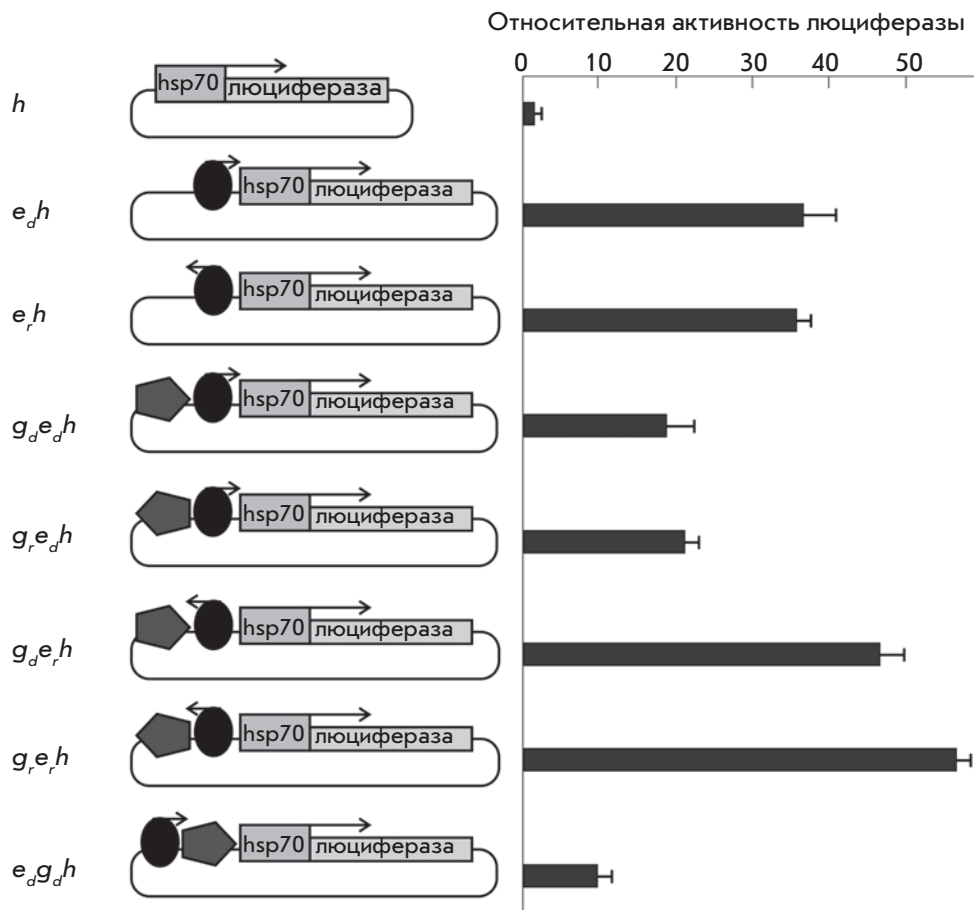


Рис. 3. Влияние инсулятора МДГ4 на активность энхансера *coria*. Результаты анализа активности комбинаций энхансера (овал) и инсулятора (пятиугольник), расположенных выше промотора *hsp70*. Ориентация энхансера *coria* показана стрелкой, ориентация инсулятора – направлением пятиугольника. На гистограмме представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

экспрессии репортерного гена. В тех случаях, когда энхансер был встроен в прямой ориентации, уровень экспрессии репортерного гена снижался примерно в 2 раза в присутствии инсулятора в любой ориентации. Таким образом, инсулятор может влиять на активность расположенного рядом энхансера, находящегося в непосредственной близости от промотора. В этом случае механизм влияния не связан с блокированием взаимодействия между энхансером и промотором. Наиболее вероятно, что подобное ингибирование транскрипции, зависящее от ориентации, связано с прямым взаимодействием белков, связанных с инсулятором и энхансером, что согласуется с данными о распределении инсуляторных белков [10].

Следующей задачей стало изучение влияния инсулятора на уровень экспрессии репортерного гена в положении между энхансером и промотором. С этой целью получили конструкцию, в которой инсулятор встроен в положение -233 п.н. относительно старта транскрипции *hsp70*-промотора (рис. 3). Энхансер находился непосредственно перед инсулятором в прямой ориентации, т.е. инсулятор располагался между

энхансером и промотором. В этом случае инсулятор снижал активность энхансера примерно в 4 раза. Таким образом, инсулятор, помещенный между энхансером и промотором, сильнее ингибирует транскрипцию репортерного гена, чем в положении выше энхансера. Этот результат согласуется с основным свойством инсуляторов – способностью блокировать энхансер, которое проявляется, когда инсулятор располагается между энхансером и промотором.

Две копии инсулятора, окружающие энхансер, полностью инактивируют его активность

Полученные результаты показывают, что одна копия инсулятора способна только частично блокировать активность энхансера в транзистентной модели на основе кольцевых плазмид. Ранее мы показали, что только две копии инсулятора МДГ4, окружающие либо энхансер, либо репортерный ген *white*, способны полностью блокировать активность энхансера в трансгенных линиях дрозофилы [21]. Согласно модели за счет взаимодействия между инсуляторами формируется хроматиновая петля, которая значительно усложняет процесс установления взаимодей-

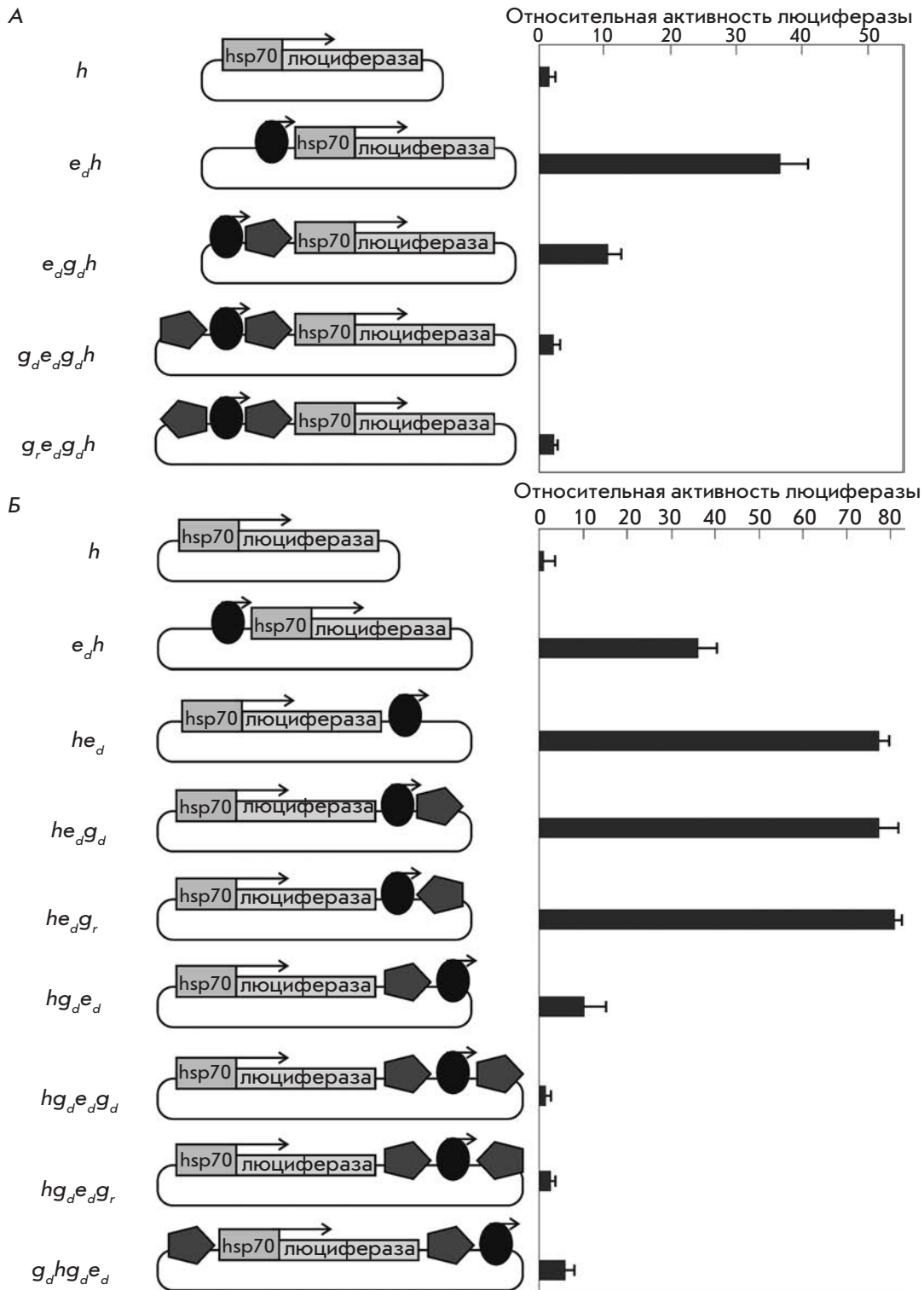


Рис. 4. Влияние двух копий инсультора МДГ4, окружающих энхансер или репортерный ген. Результаты анализа комбинаций двух копий инсультора (пятиугольник) в разной ориентации, окружающих энхансер (овал) и расположенных выше промотора *hsp70* (А) или с 3'-конца репортерного гена (Б). Ориентация энхансера *soria* показана стрелкой, ориентация инсультора – направлением пятиугольника. На гистограммах представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

ствий между белковыми комплексами, связанными с энхансерами и промоторами. Чтобы определить, будет ли выполняться это правило функционирования инсуляторов в транзиентной модели на основе кольцевой плазмиды, получили две дополнительные конструкции, в которых энхансер, локализованный перед *hsp70*-промотором, был окружен двумя инсуляторами, расположенными в одном или противоположных направлениях (рис. 4А). Оказалось, что в обоих вариантах уровень экспрессии репортерного гена близок к уровню контрольной плазмиды, которая содержит только *hsp70*-промотор. Таким образом, два инсулятора, окружающие энхансер, приводят к полной инактивации его активности, что согласуется с результатами, полученными ранее в трансгенных линиях дрозофилы.

В описанных выше опытах инсуляторы, окружающие энхансер, находились рядом с промотором. Возникает вопрос, сохранится ли эффект полного блокирования энхансера, если энхансер, окруженный инсуляторами, будет находиться на значительном расстоянии от промотора. Для ответа на этот вопрос создали серию конструкций, в которых энхансер *scoria* был встроен в прямой ориентации в положении +2230 п.н. относительно старта транскрипции репортерного гена люциферазы светлячка (рис. 4Б). В этом положении энхансер стимулировал транскрипцию репортерного гена примерно в 2 раза эффективнее, чем в положении перед промотором. В двух плаزمиды, в которых инсулятор находился в прямой/обратной ориентации с 3'-стороны от энхансера, уровень экспрессии репортерного гена оказался близким к экспрессии плазмиды, содержащей только энхансер. Таким образом, инсулятор, расположенный за энхансером, не влиял на его активность. Однако при размещении инсулятора между репортерным геном и энхансером происходило шестикратное снижение уровня экспрессии репортерного гена. Таким образом, даже в рамках кольцевой плазмиды взаимное расположение энхансера и инсулятора относительно промотора определяет эффективность ингибирования транскрипции. В следующей серии конструкций энхансер был встроен между двумя одно- или разнонаправленными инсуляторами (рис. 4Б). При транзиентной трансфекции таких плазмид в клетки Sg4 экспрессия репортерного гена детектировалась на уровне контрольной плазмиды, содержащей только *hsp70*-промотор. Таким образом, две копии инсулятора, окружающие энхансер, полностью блокируют его активность. Следовательно, расстояние между энхансером и промотором не влияет на эффективность блокирования энхансера, расположенного между парой инсуляторов.

В трансгенных линиях дрозофилы две копии инсулятора, окружающие репортерный ген, слабее блокировали активность энхансера, чем две копии инсулятора, окружающие энхансер [21]. Для дальнейшей проверки степени корреляции результатов, полученных в кольцевых плаزمиды и трансгенных линиях дрозофилы, использовали конструкцию, в которой инсуляторы окружали репортерный ген, а энхансер находился сразу за инсулятором с 3'-стороны гена. При трансфекции такой плазмиды в клетки Sg4 выявлена слабая активность энхансера, что согласуется с предположением о том, что инсуляторы в такой конфигурации не способны обеспечить полное блокирование энхансера. Полная инактивация энхансера наблюдалась только в том случае, если два инсулятора находились непосредственно рядом с энхансером. Таким образом выявлена полная корреляция между результатами, полученными на трансгенных линиях дрозофилы и в транзиентной модели в клетках Sg4.

Транскрипция с энхансера регулирует активность инсулятора МДГ4

Ранее предполагалось [10, 23, 24], что транскрипция помогает энхансеру двигаться по хроматину в поисках промотора. Согласно этой модели, инсулятор блокирует продвижение энхансера вместе с РНК-полимеразой II в сторону промотора. Транскрипция, которая инициируется на энхансере, также может непосредственно влиять на активность промотора и инсулятора.

Для исследования функциональной роли транскрипции, инициируемой на энхансере, создана серия плазмид, в которых для прерывания транскрипции используется универсальный терминатор вируса SV40 размером 220 п.н. В первой плазмиде терминатор SV40 встроен между энхансером *scoria*, расположенным в прямой ориентации, и *hsp70*-промотором (рис. 5). При трансфекции этой плазмиды в Sg4-клетки уровень экспрессии репортерного гена снижался в 2 раза по сравнению с плазмидой, содержащей только энхансер. Этот результат частично можно объяснить тем, что транскрипция, инициируемая с энхансера, вносит вклад в экспрессию репортерного гена. Терминатор SV40 прерывает эту транскрипцию и тем самым снижает уровень экспрессии репортерного гена. Однако ранее (рис. 2) мы показали, что с энхансера *scoria* нарабатывается приблизительно в 5 раз меньше люциферазы, чем с *hsp70*-промотора. Поэтому основное возможное объяснение связано с тем, что терминатор SV40 способен частично блокировать взаимодействие энхансера с промотором за счет остановки продвижения РНК-полимеразы II от энхансера в сторону промотора. Такая интерпретация согласуется с моделью,

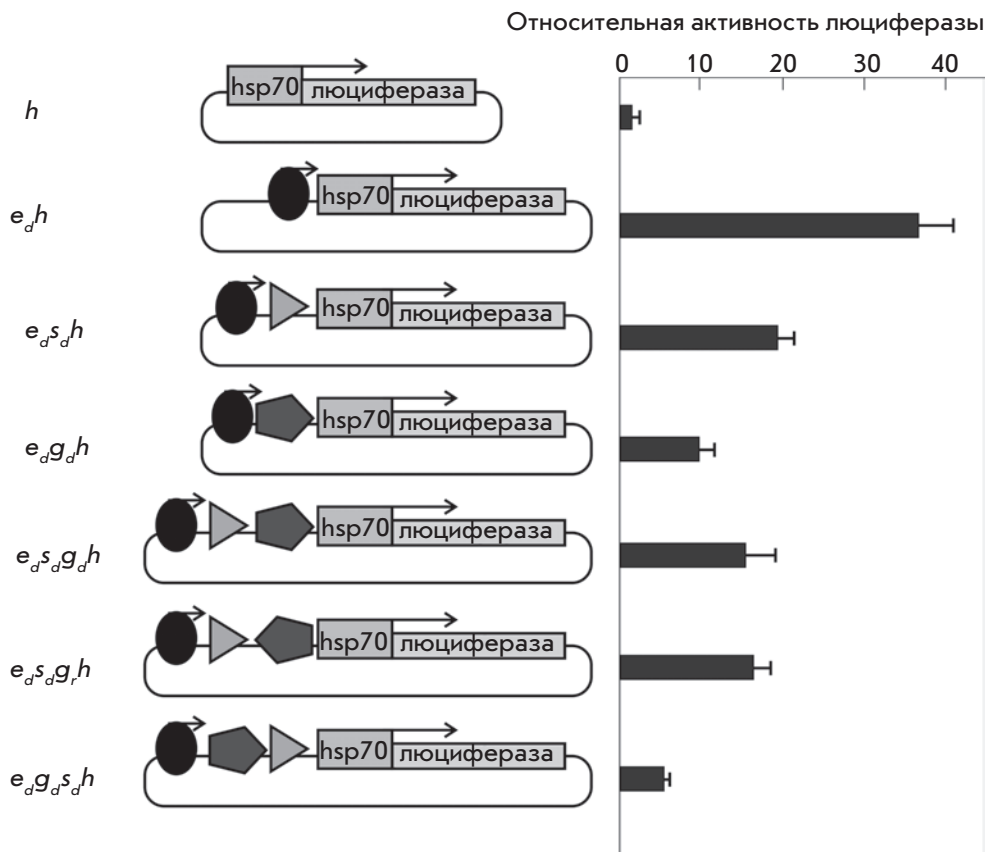


Рис. 5. Влияние транскрипции с энхансера на активность инсулятора МДГ4. Результаты анализа комбинаций инсулятора (пятиугольник) в разной ориентации, энхансера (овал) и терминатора транскрипции вируса SV40 (треугольник), расположенных выше промотора *hsp70*. Ориентация энхансера *scoria* показана стрелкой, ориентация инсулятора – направлением пятиугольника, ориентация терминатора SV40 показана направлением треугольника. На гистограмме представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

согласно которой РНК-полимераза II играет определенную роль при передаче сигнала от энхансера к промотору [10, 24, 25].

В следующих двух плаزمиды энхансер, расположенный в прямой ориентации относительно промотора, был отделен от промотора терминатором SV40 и инсулятором, встроенным в прямой или обратной ориентации (рис. 5). При трансфекции любой из этих плазмид в клетки Sg4 экспрессия репортерного гена оставалась на том же уровне, как и у плазмиды, содержащей только терминатор SV40. Интересно, что при этом в присутствии комбинации инсулятора и терминатора транскрипция достигала более высокого уровня по сравнению с плазмидой, содержащей только инсулятор. Таким образом, терминатор SV40 частично супрессирует блокирующую активность инсулятора вместо ожидаемого аддитивного негативного эффекта инсулятора и терминатора SV40 на экспрессию репортерного гена. При трансфекции в клетки Sg4 плазмиды, в которой инсулятор и терминатор поменяли местами, в результате чего инсулятор оказался между энхансером и терминатором, наблюдалось снижение уровня экспрессии репортерного гена (рис. 5). Полученные данные позволяют предположить, что транскрипция с энхансера уси-

ливает активность инсулятора, что приводит к более эффективному блокированию энхансера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в нашей работе данные предполагают, что эмбриональные клеточные линии дрозофилы, имеющие общее происхождение, отличаются по уровню экспрессии в них транскрипционных факторов, необходимых для функционирования энхансера *scoria*. По-видимому, в эмбриональных клеточных линиях может варьировать экспрессия и других генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые не являются необходимыми для поддержания клеточной линии. Таким образом, клеточные линии, даже имеющие общее происхождение, могут значительно отличаться по набору транскрипционных факторов и, как следствие, по функциональной активности регуляторных элементов.

Нами доработана модельная система, позволяющая изучать активность инсуляторов в эмбриональных клеточных линиях дрозофилы. В транзientной модели на кольцевых плаزمиды наиболее хорошо известный инсулятор МДГ4 сохраняет свои основные свойства, описанные при использовании модельных систем на основе трансгенных линий дрозофилы [25].

Одна копия инсулятора только частично блокирует активность энхансера, в то же время две копии, окружающие либо энхансер, либо репортерный ген, приводят к полной инактивации энхансера.

Недавно в нашей лаборатории было показано, что транскрипция через энхансер ингибирует его активность [26]. В настоящей работе установлено, что энхансер *coria* обладает свойствами слабого двустороннего промотора, и транскрипция с энхансера

может усиливать способность инсулятора МДГ4 блокировать активность энхансера. Действительно, существует ряд данных, согласно которым связывание транскриптов с комплексом Su(Hw) может регулировать активность инсулятора [27, 28]. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maksimenko O., Georgiev P. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 28.
- Spitz F., Furlong E.E. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. P. 613–626.
- Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 2361–2375. doi: 10.1007/s00018-015-1871-9.
- Chetverina D., Aoki T., Erokhin M., Georgiev P., Schedl P. // *BioEssays.* 2014. V. 36. P. 163–172.
- Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 8–14.
- Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development.* 2012. V. 139. P. 1045–1057.
- Matzat L.H., Lei E.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1839. P. 203–214.
- Федосеева Д.М., Чуриков Н.А. // *ДАН.* 2013. Т. 451. С. 339–343.
- Bohla D., Herold M., Panzer I., Buxa M.K., Ali T., Demmers J., Krüger M., Scharfe M., Jarek M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e107765.
- Tchurikov N.A., Kretova O.V., Moiseeva E.D., Sosin D.V. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 111–122.
- Dai Q., Ren A., Westholm J.O., Serganov A.A., Patel D.J., Lai E.C. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 602–614.
- McDonald J.F., Matyunina L.V., Wilson S., Jordan I.K., Bowen N.J., Miller W.J. // *Genetica.* 1997. V. 100. P. 3–13.
- Wilson S., Matyunina L.V., McDonald J.F. // *Gene.* 1998. V. 209. P. 239–246.
- Cavarec L., Jensen S., Casella J.F., Cristescu S.A., Heidmann T. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 482–494.
- Cavarec L., Heidmann T. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5041–5049.
- Cavarec L., Jensen S., Heidmann T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 392–399.
- Holdridge C., Dorsett D. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. P. 1894–1900.
- Geyer P.K., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 1865–1873.
- Mazo A.M., Mizrokhi L.J., Karavanov A.A., Sedkov Y.A., Krichevskaja A.A., Ilyin Y.V. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 903–911.
- Maksimenko O., Golovnin A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 5469–5477.
- Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. P. e1003606.
- Смирнов Н.А., Дидыч Д.А., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Свердлов Е.Д. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. С. 1141–1150.
- Zhao H., Dean A. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 4903–4919.
- Zhu X., Ling J., Zhang L., Pi W., Wu M., Tuan D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 5532–5544.
- Ling J., Ainol L., Zhang L., Yu X., Pi W., Tuan D. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51704–51713.
- Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenetics Chromatin.* 2013. V. 6. P. 31.
- King M.R., Matzat L.H., Dale R.K., Lim S.J., Lei E.P. // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. P. 2956–2966.
- Názer E., Lei E.P. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014. V. 25. P. 68–73.

УДК 577.2

Профилирование рибосом *Mycoplasma gallisepticum*

Г. Ю. Фисунов*, Д. В. Евсютина, А. А. Арзамасов, И. О. Бутенко, В. М. Говорун
 Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА России, 119435,
 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а
 *E-mail: herr.romanoff@gmail.com
 Поступила в редакцию 16.06.2015

РЕФЕРАТ Успешное применение высокопроизводительных технологий все чаще приводит к обнаружению случаев низкой корреляции между уровнем мРНК и белков в клетках. Это явление, противоречащее классическим представлениям, обнаружено у ряда бактерий, таких, как *Escherichia coli*, *Desulfovibrio vulgaris* и *Lactococcus lactis*. Поэтому важной представляется разработка технологий исследования механизмов регуляции экспрессии генов на уровне трансляции, в том числе высокопроизводительными методами. Проведено протеомное профилирование рибосом *Mycoplasma gallisepticum*, обнаружен ряд неканонических белков, связанных с рибосомами в большом количестве. Показано, что количество мРНК, связанной с рибосомами, определяется, в основном, двумя параметрами: уровнем транскрипции гена этой мРНК и эффективностью комплементарных взаимодействий между 3'-концом 16S рРНК и сайтом связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микоплазма, рибосома, профилирование рибосом.

ВВЕДЕНИЕ

Проведение системных исследований с использованием «омиксных технологий» все чаще выявляет неожиданные явления и новые регулируемые события, которые просто невозможно определить, используя одну омиксную технологию или традиционные методы анализа. Вместе с тем, совместный анализ данных, полученных при количественных определениях содержания РНК или белков и пептидов, неизбежно генерирует значительное количество артефактов вследствие погрешностей каждого из используемых технологических приемов. Это требует тщательного перекрестного анализа, а также дополнительного подтверждения получаемых данных с использованием альтернативных или ортогональных технологических приемов. Поэтому простейшие микроорганизмы неслучайно служат объектами для отработки общей методологии анализа совместного поведения макромолекул в живых системах и их взаимного влияния друг на друга.

Европейское молекулярно-биологическое сообщество сформулировало проект, посвященный изучению возбудителя респираторных заболеваний человека, представителя класса Mollicutes – *Mycoplasma pneumoniae* [1, 2]. Затем наша группа выбрала другого представителя этого класса – *M. gallisepticum* – для проведения аналогичных работ. Вскоре после этого американские исследователи смогли по-

строить компьютерную модель метаболизма и адаптивных реакций у наименьшей самореплицирующейся бактерии – *M. genitalium* [3]. Несмотря на эти успехи, неизученными остаются большое количество вопросов, которые требуют привлечения дополнительных методов, необходимых для измерения динамических процессов при реализации минимального набора генетической информации, закодированной в геноме микоплазм.

Молликуты, к которым относится *M. gallisepticum*, характеризуются существенной редукцией генома. Средний размер генома микоплазм составляет 0.8–1 млн п.н. (1 млн у *M. gallisepticum*) [4]. В связи с редукцией генома у микоплазм утрачены известные системы регуляции экспрессии генов [5].

Как показано нами ранее, *M. gallisepticum* отвечают на стрессовые воздействия на уровне транскрипции [6]. В то же время эти изменения в целом слабо отражаются на уровне трансляции [6]. У этого явления могут быть две причины: скорость трансляции у *M. gallisepticum* слишком мала для того, чтобы изменения на уровне белка стали видимыми за время эксперимента (30 мин); мРНК селективно связывается с рибосомами во время стрессового ответа. Механизм селективного связывания мРНК с рибосомами может быть реализован через взаимодействие с антисмысловыми РНК, блокирующими сайт связывания рибосомы [7]. Кроме того, даже в пределах од-

ной клетки рибосомы могут отличаться друг от друга как по нуклеотидной последовательности рРНК [8], так и своему белковому составу. Например, рибосомы *Escherichia coli*, не имеющие в своем составе белка S1, транслируют преимущественно безлидерные транскрипты [9]. С рибосомами могут быть ассоциированы регуляторные белки, модулирующие процесс трансляции отдельных транскриптов [10]. В комплексе с рибосомой могут находиться «неканонические» белки, основная функция которых не имеет ничего общего с процессом трансляции. Например, гликогенсинтаза *Saccharomyces cerevisiae* может влиять на трансляцию ряда РНК [11].

Развитие высокопроизводительных технологий привело к накоплению большого объема данных, характеризующих процессы транскрипции и трансляции в масштабе целой клетки. Согласно классическим представлениям, уровень белка в целом определяется уровнем соответствующей мРНК, однако, в ряде случаев это не так. Высокопроизводительные технологии значительно увеличили количество случаев, когда уровень белка не коррелирует с уровнем мРНК. Такие данные получены для различных бактерий, включая *E. coli* [12], *Desulfovibrio vulgaris* [13] и *Lactococcus lactis* [14]. Коэффициент корреляции Пирсона между уровнем мРНК и уровнем белка, согласно опубликованным данным, может варьировать от 0.53 до 0.19 в зависимости от вида и состояния бактерии. Значительный прогресс в изучении регуляции экспрессии генов на уровне трансляции достигнут при использовании технологии профилирования рибосом [15], позволяющей наблюдать процесс трансляции почти в реальном времени. Таким образом, этап связывания мРНК с рибосомой и ее трансляции является чрезвычайно важным звеном регуляции экспрессии генов у бактерий. Поскольку для моликут в целом и *M. gallisepticum* в частности характерна сильная редукция регуляторных механизмов, работающих на уровне транскрипции, регуляция экспрессии генов на уровне трансляции может быть едва ли не самым важным звеном, определяющим представленность белков в клетке.

В настоящей работе проведены высокопроизводительное протеомное профилирование рибосом *M. gallisepticum* для определения их состава и транскрипционное профилирование мРНК, связанной с рибосомами, методом ПЦР в реальном времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток *M. gallisepticum* S6

Культуру клеток *M. gallisepticum* S6 культивировали в жидкой среде (Триптоза 20 г/л, NaCl 5 г/л, KCl

1.3 г/л, Трис 3 г/л, дрожжевой диализат 5%, сыворотка крови лошади 10% («Биолот»), глюкоза 1%, рН 7.4) до середины логарифмической фазы как описано в [16].

Выделение рибосом

К 12 мл культуры клеток *M. gallisepticum* добавляли хлорамфеникол до конечной концентрации 100 мкг/мл, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин на льду. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4500 g (20 мин при 4°C). Супернатант отбирали и суммарный осадок клеток, полученный с 50 мл культуры, ресуспендировали в 500 мкл буфера для лизиса (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 2 mM спермидина, 100 мкг/мл хлорамфеникола, 5 мкл ингибитора протеаз (GE Healthcare), 200 ед. ингибитора РНКаз (Thermo Scientific), рН 7.5). После ресуспендирования к буферу добавляли 15 мкл NP-40 и тщательно перемешивали. Клеточный лизат замораживали при -75°C не менее 1 ч. Затем клеточный лизат осветляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант отбирали и фракционировали с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы.

Ступенчатый градиент сахарозы создавали в 5-мл поликарбонатной пробирке путем послойного нанесения раствора сахарозы разной плотности с помощью пипетки. Объем каждого слоя – 750 мкл, шаг ступени – 10%. В настоящей работе использовали градиент 10–50% сахарозы (всего пять ступеней). Раствор сахарозы готовили на таком же буфере, как для лизиса клеток (без добавления NP-40, хлорамфеникола, ингибиторов протеаз и РНКаз) при 50000 об/мин (среднее ускорение 200620 g) в течение 1 ч при 4°C, центрифуга Optima (Beckman Coulter), бакет-ротатор MLS 50 (Beckman Coulter). Фракции объемом 200 мкл отбирали с помощью пипетки.

Выделение РНК из фракций

К каждой фракции добавляли 400 мкл реагента Trizol LS (Life Technologies). Смесь тщательно перемешивали и добавляли 200 мкл хлороформа, еще раз перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 16000 g и 4°C. Супернатант отбирали, добавляли равный объем изопропанола. Препарат инкубировали при -20°C не менее 1 ч. РНК осаждали центрифугированием при 16000 g (20 мин, 4°C). Осадок промывали 80% (об./об.) этанолом. Препарат РНК растворяли в 10 мкл воды (Panreac). Представленность РНК во фракциях измеряли с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Эксперимент проводили в трех биологических повторностях.

Выделение белка из фракций и трипсинолиз

Для осаждения белков фракцию разводили в 10 раз в деионизованной воде и добавляли трихлоруксусную кислоту (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 10% (об./об.), выдерживали при 4°C в течение ночи с последующим центрифугированием (15 мин при 16000 g). Полученные осадки промывали 2 раза 1 мл холодного ацетона (Pancreas) для удаления остатков трихлоруксусной кислоты.

Белковые осадки перерастворяли в 25–35 мкл 50 мМ раствора гидрокарбоната аммония (Pancreas), содержащего 0.5% RapiGest SF (Waters) и 1 мкл смеси нуклеаз (GE Healthcare), после чего выдерживали в течение 30 мин при 4°C, инкубировали в течение 5 мин при 100°C и центрифугировали (10 мин при 16000 g). Супернатант отбирали и определяли концентрацию белка в каждом образце с использованием бицинхониновой кислоты (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich). Для восстановления дисульфидных мостиков к растворам белков добавляли дитиотреитол (Bio-Rad) до конечной концентрации 10 мМ, реакцию проводили в течение 30 мин при 60°C на шейкере (600 об/мин). Последующее алкилирование остатков цистеина йодацетамидом (конечная концентрация 30 мМ) (Bio-Rad) проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем к образцам белков добавляли трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) в соотношении масса трипсина/масса белка 1 : 50. Трипсинолиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 10% трифторуксусной кислоты (Sigma-Aldrich) до pH 2.0, после чего продукты инкубировали в течение 45 мин при 37°C и центрифугировали (15 мин при 16000 g) для удаления RapiGest SF. Смеси триптических пептидов дополнительно очищали путем твердофазной экстракции с использованием мини-колонок Discovery DSC-18 (Supelco) согласно рекомендациям производителя. Для дальнейшего масс-спектрометрического анализа элюаты высушивали на вакуумном концентраторе CentriVar (Labconco) и растворяли в 10 мкл 3% раствора ацетонитрила, содержащего 0.1% муравьиную кислоту.

Выделение РНК из культуры клеток

РНК из культуры клеток выделяли согласно [16]. К аликвоте клеточной культуры добавляли тройной объем реагента Trizol LS (Thermo Scientific). Разделение фаз проводили, добавляя хлороформ из расчета 80 мкл на 100 мкл культуры. Образцы центрифугировали при 16000 g в течение 15 мин при 4°C. Далее РНК переосаждали изопропанолом в объемном соотношении 1 : 1.

Синтез κДНК и κПЦР

Синтез κДНК и ПЦР в реальном времени проводили как описано в [16]. РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific). Затем κДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы H-minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) и случайных гексамеров. Для увеличения стабильности РНК использовали ингибитор РНКазы RiboLock (Thermo Scientific).

Количественную ПЦР в реальном времени (κПЦР) проводили на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad) с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad). Для проведения ПЦР использовали ×10 ПЦР-буфер («Литех») (конечное разведение ×1.5) и ×10 раствор dNTP («Литех»), Taq-полимеразу («Литех»), краситель SYBR Green I (Life Technologies), по 5 пмоль праймеров, 2% формамида. Данные нормировали по средней представленности мРНК 21 гена домашнего хозяйства (*eno*, *gaphd*, *tpiA*, *tuf*, *tsf*, *acoA*, *acoB*, *aceF*, *ldh*, *ackA*, *pgk*, *fba*, *pgi*, *pfkA*, *gpmI*, *pykF*, *tktA1*, *rpiB*, *eutD*, *prsA*, *lpd*). Использовали те же праймеры для κПЦР, что и ранее [6].

Идентификация белков

Хроматомасс-спектрометрический анализ пептидных экстрактов проводили с помощью масс-спектрометра Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific), сопряженного с хроматографической системой Ultimate 3000 RSLCnano (Dionex) через источник ионов Nanospray Flex (Thermo Fisher Scientific).

Пептиды разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии с использованием предколонки Acclaim PepMap (сорбент – C18, длина – 2 см, внутренний диаметр – 75 мкм, размер частиц – 3 мкм, диаметр пор – 100 Å, Dionex) и колонки Zorbax (сорбент – Zorbax 300SB-C18, длина – 15 см, внутренний диаметр – 75 мкм, размер частиц – 3.5 мкм, диаметр пор – 100 Å, Agilent Technologies). Каждую пробу наносили на предколонку в воде для ВЭЖХ с 0.1% муравьиной кислоты (об./об.) со скоростью потока 2 мкл/мин в течение 5 мин, после чего предколонку включали в линию перед колонкой. Пептиды элюировали смесью растворителей А (вода для ВЭЖХ с 0.1% муравьиной кислоты (об./об.)) и Б (79.9% ацетонитрила для ВЭЖХ (об./об.), 20% воды для ВЭЖХ и 0.1% муравьиной кислоты (об./об.)), линейно повышая содержание растворителя Б от 5 до 40% (об./об.) в течение 120 мин при скорости потока 300 нл/мин, после чего систему промывали в течение 10 мин смесью с 99% (об./об.) растворителя Б, а затем в течение 10 мин смесью с 5% растворителя Б.

Напряжение источника 2000 В, а температура капилляра 200°C. Масс-спектрометр работал в режиме данных-зависимого анализа: в каждом цикле снима-

ли обзорный масс-спектр, 20 наиболее интенсивных в обзорном масс-спектре ионов поочередно отбирали для фрагментации и записи масс-спектра дочерних ионов, после чего исключали из рассмотрения на 10 с. Обзорный масс-спектр снимали при разрешении 70000 в диапазоне отношений массы к заряду от 400 до 1200 m/z с параметром автоматической регулировки усиления (AGC) 106 и ограничением по времени заполнения в 50 мс. Спектры дочерних ионов снимали при разрешении 17500 и AGC – 105 с ограничением по времени заполнения в 100 мс. Параметр энергии столкновений был равен 30, ширина полосы пропускания – 2.

На основе полученных масс-хроматограмм (формата.raw) с помощью утилиты MSConvert пакета ProteoWizard (версия 3.0.7.414, 64 бита) составляли список спектров фрагментации в центроидном виде в формате Mascot Generic Format, которые затем интерпретировали с помощью поисковой машины Mascot (Matrix Science Inc.). Идентификацию проводили по базе белковых последовательностей *M. gallisepticum* S6 CP006916.2 с добавленными к ней последовательностями часто встречающихся белковых контаминантов. Использовали следующие параметры идентификации – триптические пептиды с не более чем одним пропущенным сайтом расщепления трипсином, заряд прекурсоров – +2 или +3, допустимая ошибка масс родительских ионов – 10 ppm, допустимая ошибка масс фрагментов – 0.5 Да, инструмент – ESI-TRAP, постоянные модификации – нет, переменные модификации – карбамидометилирование цистеина и окисление метионина.

Список статистически значимых идентификаций определяли как список белков, для которых идентифицировано два или более пептида со значимостью выше 0.05 согласно рангу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение РНК в выделенных фракциях

После фракционирования цитоплазмы *M. gallisepticum* распределение РНК во фракциях измеряли с помощью ОТ-кПЦР (см. «Экспериментальную часть»). Результаты представлены на рис. 1, на котором видно, что малые субъединицы и полноразмерные рибосомы образуют пики в соответствующих фракциях (7 и 11). Для *M. gallisepticum* характерен примерно четырехкратный избыток 16S рРНК по сравнению с 23S рРНК [16], что согласуется с наблюдаемой картиной. Во фракциях после 12–22 наблюдается эквимолярное соотношение 16S и 23S рРНК. Относительно высокое содержание мРНК выявлено только в полисомах (фракции 15 и больше).

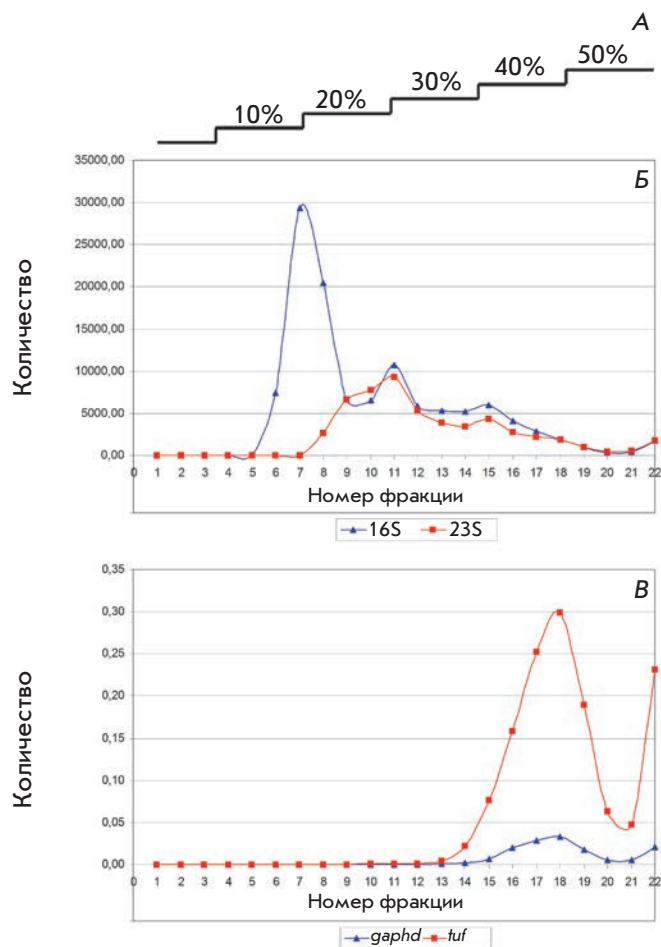


Рис. 1. Фракционирование цитоплазматической фракции *M. gallisepticum* в градиенте сахарозы. Измеряли распределение во фракциях – 16S рРНК, 23S рРНК, мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (*gapdh*) и фактора трансляции EF-Tu (*tuf*). Все результаты (для рРНК и мРНК) нормированы на количество 16S рРНК во фракции номер 1. А – профиль ступенчатого градиента в масштабе относительно полученных фракций; Б – распределение рРНК по фракциям; В – распределение мРНК по фракциям

Наибольшим было количество мРНК во фракциях 17 и 18, где оно составляло примерно 1 мкг. Это делает соответствующие фракции наиболее удобными для последующего анализа, особенно методами высокопроизводительного секвенирования.

Пригодность методики для количественного анализа представленности транскриптов, связанных с рибосомами, проверяли на фракции номер 18. Было проведено транскрипционное профилирование методом кПЦР 67 генов в трех биологических повторах. Воспроизводимость полученных данных оценили ме-

Корреляция по Спирману между биологическими повторами выделения мРНК, связанной с рибосомами, фракция номер 18. Представленность РНК измеряли методом ПЦР в реальном времени

	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3
Повтор 1	1	0.87	0.92
Повтор 2	0.87	1	0.90
Повтор 3	0.92	0.90	1

тодом корреляции по Спирману (таблица). Во всех парах образцов корреляция составила 0.87–0.92, что говорит о хорошей воспроизводимости методики. Корреляция между представленностью транскриптов во фракции, связанной с рибосомами мРНК, и в суммарной цитоплазматической фракции мРНК составила 0.78.

Протеомное профилирование рибосом

M. gallisepticum

С целью валидации методики выделения рибосом из клеток *M. gallisepticum* проведено протеомное профилирование фракций 7 (30S субъединицы), 17 и 18 (70S рибосомы, связанные с мРНК), и получена полуколичественная оценка представленности белков с помощью индекса emPAI.

Во фракции 7 обнаружено 18 из 20 белков малой субъединицы рибосомы и только 8 из 33 белков большой субъединицы, что согласуется с данными о распределении рРНК во фракциях. Таким образом, во фракции 7 преимущественно содержатся малые субъединицы рибосомы. Необходимо отметить, что фракция 7 содержит значительное количество примеси других клеточных белков.

Во фракциях 17 и 18, как и ожидалось, наиболее представлены рибосомные белки. Всего обнаружено 47 рибосомных белков из 53 (19 из 20 белков 30S субъединицы и 28 из 33 50S субъединицы). Все не найденные белки имеют небольшой размер (менее 100 аминокислотных остатков), что, вероятно, и стало причиной отсутствия их идентификации. Представленность рибосомных белков в данной фракции можно оценить как эквивалентную. Белки малой и большой субъединиц набирают одинаковые индексы emPAI. Кроме того, во фракции 18 обнаружено высокое содержание белков, ассоциированных с рибосомами (факторы трансляции EF-Tu и EF-Ts, шапероны Tig и DnaK), а также белка HU. Известно, что этот белок, бактериальный аналог гистонов,

способен связывать как ДНК, так и РНК [17]. Не исключено, что он также способен связывать мРНК или рРНК в составе рибосом.

Во фракции 18 нами выявлен белок GCW_03230 с высоким индексом emPAI. Это консервативный белок с неизвестной функцией, встречающийся у многих микоплазм. Его особенностью является экстремальное значение pI 11.0 при небольшой длине (74 аминокислотных остатка), что делает его похожим на рибосомные белки. Возможно, GCW_03230 – новый рибосомный белок. Во фракции 18 также обнаружено некоторое количество белков с достаточно высоким индексом представленности emPAI, не имеющих прямого отношения к процессу трансляции. Например, это триозофосфатизомераза, тиоредоксин, ряд белков с неизвестной функцией. Их присутствие, с одной стороны, можно объяснить неспецифическим взаимодействием с рибосомами после лизиса клетки. С другой стороны, за последнее время показано, что такие белки могут модулировать активность рибосомы *in vivo* [11].

Влияние вторичных структур и сайта связывания рибосомы на представленность мРНК в пуле, связанном с рибосомами

Наши результаты показывают, что представленность мРНК во фракции, связанной с рибосомами, в целом, соответствует представленности мРНК во фракции суммарной РНК. Однако ряд мРНК содержится в этой фракции в значимо большем или меньшем количестве. Эффективность связывания мРНК с рибосомой определяется в том числе комплементарными взаимодействиями между 3'-концом 16S рРНК и сайтом связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК, а также наличием вторичных структур в этой области, способствующих или препятствующих связыванию рибосомы.

С помощью программы RNAduplex мы провели *in silico* моделирование взаимодействия между 3'-концевой последовательностью 16S рРНК (UUACCUCUUUCU, подчеркнут канонический сайт связывания рибосомы в *E. coli*) и 25-нуклеотидной последовательностью перед старт-кодоном каждого гена. В результате получены оценки силы связывания 16S рРНК с 5'-нетранслируемой областью соответствующих мРНК. Корреляция (по Спирману) между нашей оценкой силы сайта связывания рибосомы и представленностью соответствующей мРНК во фракции РНК, связанной с рибосомами, составила 0.39 ($p < 0.01$). Мы выбрали мРНК более чем в 2 раза перепредставленные (19) и недопредставленные (25) во фракции, связанной с рибосомами, по сравнению с суммарной мРНК. Энергия образования дуплекса с 3'-концевой областью 16S рРНК у 5'-нетранс-

лируемой области перепредставленных мРНК была в среднем в 2 раза меньше, чем у недопредставленных ($dG = -4.96$ и -2.52 ккал/моль соответственно).

Некоторые мРНК, такие, как *GCW_02495* и *putA*, несмотря на низкую расчетную эффективность связывания с рибосомой ($dG > 0$), лучше представлены во фракции, связанной с рибосомами, чем в суммарной РНК. В случае *GCW_02495* этот парадокс можно объяснить тем, что ген *GCW_02495* экспрессируется в составе полицистронной мРНК вместе с соседним геном *GCW_02490*, который имеет очень эффективный сайт связывания рибосомы ($dG = -11.8$ ккал/моль). Таким образом, соответствующая мРНК, в целом, хорошо связывается с рибосомой.

Ряд мРНК менее представлен в связанной с рибосомами фракции, чем в суммарной РНК, несмотря на предсказанную эффективность связывания с рибосомой. К таким мРНК относятся *GCW_00085*, *glpF*, *gyrA*, *gyrB*, *ruvA*, *potD* и *hrcA*. Подобное поведение можно объяснить присутствием неких вторичных структур в 5'-нетранслируемой области мРНК, препятствующих связыванию рибосомы. С помощью программы quickfold мы рассчитали величины dG образования шпильчатых структур в районе сайта связывания рибосом и сайт-кодона с помощью скользящего окна длиной 30 нуклеотидов. В результате обнаружили, что величина dG структуры в районе сайт-кодона коррелирует с представленностью мРНК в связанной с рибосомами фракции (рис. 2). Наилучшая корреляция наблюдается в диапазоне $-21...+9$ нуклеотидов от сайт-кодона как для представленности мРНК в связанной с рибосомами фракции, так и для относительного обогащения связанной с рибосомами мРНК относительно суммарной РНК. Таким образом, представленность мРНК в связанной с рибосомами фракции *M. gallisepticum* может модулироваться с помощью вторичных структур в районе сайт-кодона.

ВЫВОДЫ

Результаты нашей работы позволяют заключить, что количество мРНК, связанной с рибосомами, у *M. gallisepticum* в основном определяется двумя параметрами: уровнем транскрипции соответствующего гена и эффективностью комплементарных взаимодействий между 3'-концом 16S рРНК и сайтом

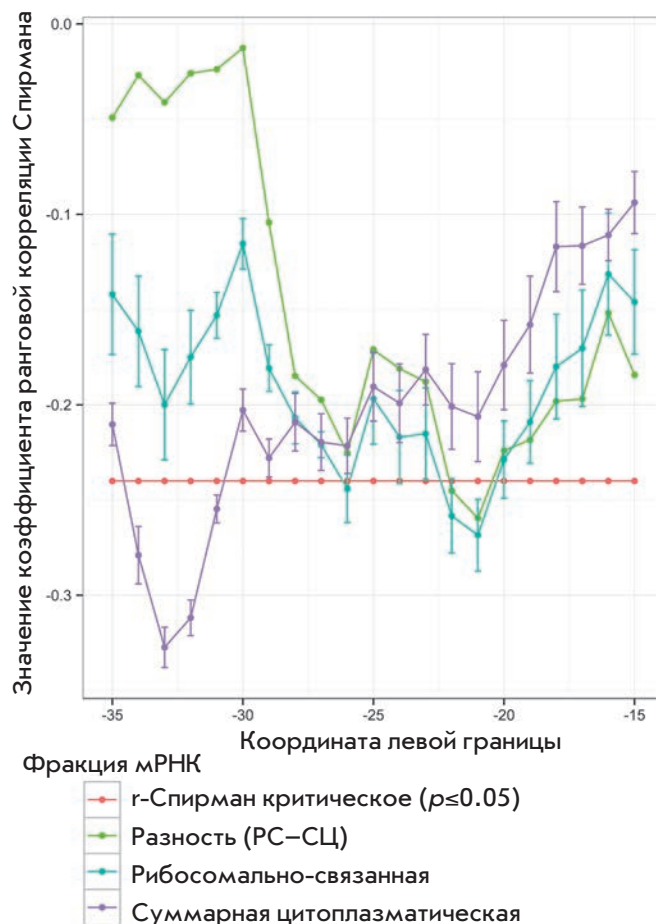


Рис. 2. Корреляция между представленностью мРНК в соответствующей фракции и величиной dG структуры в районе сайт-кодона в скользящем окне длиной 30 нуклеотидов. Уровень значимости $p < 0.05$ для значения корреляции > 0.25

связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК. Нами разработана количественная и воспроизводимая методика получения фракции связанной с рибосомами мРНК *M. gallisepticum*, которая может использоваться для изучения процесса трансляции у этой бактерии. ●

Работа финансировалась грантом РНФ (№ 14-24-00159).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Güell M., van Noort V., Yus E., Chen W.-H., Leigh-Bell J., Michalodimitrakis K., Yamada T., Arumugam M., Doerks T., Kühner S., et al. // Science. 2009. V. 326. № 5957. P. 1268–1271.
- Kühner S., van Noort V., Betts M.J., Leo-Macias A., Batisse C.,

- Rode M., Yamada T., Maier T., Bader S., Beltran-Alvarez P., et al. // Science. 2009. V. 326. № 5957. P. 1235–1240.
- Karr J.R., Sanghvi J.C., MacKlin D.N., Gutschow M.V., Jacobs J.M., Bolival B., Assad-Garcia N., Glass J.I., Covert M.W. // Cell. 2012. V. 150. № 2. P. 389–401.

4. Fisunov G., Alexeev D., Bazaleev N., Ladygina V., Galyamina M., Kondratov I., Zhukova N., Serebryakova M., Demina I., Govorun V. // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. e21964.
5. Moreno-Campuzano S., Janga S.C., Pérez-Rueda E. // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 147.
6. Mazin P.V., Fisunov G.Y., Gorbachev A.Y., Kapitskaya K.Y., Altukhov I.A., Semashko T.A., Alexeev D.G., Govorun V.M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 21. P. 13254–13268.
7. Faner M.A., Feigh A.L. // Methods. 2013. V. 63. № 2. P. 144–159.
8. Hillebrand A., Wurm R., Menzel A., Wagner R. // Biol. Chem. 2005. V. 386. № 6. P. 523–534.
9. Moll I., Resch A., Bläsi U. // FEBS Lett. 1998. V. 436. № 2. P. 213–217.
10. Shi J., Jin Y., Bian T., Li K., Sun Z., Cheng Z., Jin S., Wu W. // Mol. Microbiol. 2015. doi: 10.1111/mmi.13126.
11. Fuchs G., Diges C., Kohlstaedt L.A., Wehner K.A., Sarnow P. // J. Mol. Biol. 2011. V. 410. № 1. P. 118–130.
12. Lu P., Vogel C., Wang R., Yao X., Marcotte E.M. // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. № 1. P. 117–124.
13. Nie L., Wu G., Zhang W. // Genetics. 2006. V. 174. № 4. P. 2229–2243.
14. Picard F., Milhem H., Loubière P., Laurent B., Coccagn-Bousquet M., Girbal L. // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 528.
15. Ingolia N.T. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 3. P. 205–213.
16. Gorbachev A.Y., Fisunov G.Y., Izraelson M., Evsyutina D.V., Mazin P.V., Alexeev D.G., Pobeguts O.V., Gorshkova T.N., Kov-alchuk S.I., Kamashev D.E., et al. // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 726.
17. Balandina A., Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 31. P. 27622–27628.

УДК 578.821.5:615.371

Аттенуация вируса осповакцины

С. Н. Якубицкий¹, И. В. Колосова¹, Р. А. Максюттов¹, С. Н. Щелкунов^{1,2*}¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., Кольцово²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

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

Поступила в редакцию 30.03.2015

РЕФЕРАТ Прекращение противооспенной вакцинации 35 лет назад привело к тому, что большинство людей в мире не имеют иммунитета не только против натуральной оспы, но и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Поэтому важную задачу представляет разработка современной безопасной вакцины против ортопоксвирусов. На основе штамма L1VP вируса осповакцины (ВОВ), используемого для вакцинации, создан рекомбинантный вариант 1421ABJCN с нарушением пяти генов вирулентности, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), γ -интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*) и Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства ВОВ на культурах клеток млекопитающих. Штамм 1421ABJCN характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным L1VP. При интрацеребральном введении продукция вируса 1421ABJCN в головном мозге новорожденных мышей снижена на три порядка по сравнению с родительским ВОВ L1VP. Установлено, что при подкожном введении мышам рекомбинантный вариант 1421ABJCN индуцирует выработку ВОВ-нейтрализующих антител на уровне родительского штамма L1VP и обеспечивает полную защиту мышей от летальной дозы высокопатогенного для них вируса экстремелии. Рекомбинантный вариант ВОВ может быть использован в качестве безопасной живой культуральной вакцины нового поколения для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аттенуация, вакцина, вирус осповакцины, гены вирулентности, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; ВНО – вирус натуральной оспы; ВОВ – вирус осповакцины; ВОК – вирус оспы коров; ВЭ – вирус экстремелии; ИФН – интерферон; КСБ – комплементсвязывающий белок; L1VP – штамм Л-ИВП вируса осповакцины; MCS – нуклеотидная последовательность с сайтами гидролиза для набора эндонуклеаз рестрикции; ПЦР – полимеразная цепная реакция; *gpt* – ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы; ЦПД – цитопатическое действие.

ВВЕДЕНИЕ

В 1980 году после объявления о ликвидации натуральной оспы Всемирной организацией здравоохранения было рекомендовано прекратить вакцинацию людей против данного особо опасного заболевания [1]. Такое решение было обусловлено тем, что прививки вируса осповакцины (ВОВ) могли в ряде случаев приводить к тяжелым поствакцинальным осложнениям, иногда со смертельным исходом [1, 2].

В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы в человеческой популяции с каждым годом становится все меньше людей со специфическим иммунитетом против данного заболевания. Это делает человечество беззащитнее не только перед возможным инфицированием вирусом натуральной оспы (ВНО), но и другими близкородственными ортопоксвирусами, природным резервуаром которых

служат различные животные, в первую очередь, грызуны [3]. К таким вирусам относятся вирусы оспы обезьян (ВОО) и оспы коров (ВОК), вызывающие оспоподобные заболевания животных и человека. Распространение этих вирусов в человеческой популяции потенциально может привести к их адаптации к защитным системам организма человека и появлению вирусных вариантов, эпидемически опасных для людей [3, 4]. В последние годы в различных регионах мира стали регистрировать необычно массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей [3]. Кроме того, большую опасность представляет потенциальная возможность использования ВНО в качестве агента биотеррористических атак [5].

Единственным эффективным методом борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека является вакцинопрофилактика [1, 2].

Накопление в последние десятилетия в человеческой популяции иммунодефицитных состояний привело к тому, что использование классических живых вакцин на основе ВОВ для вакцинации населения сейчас противопоказано, так как может привести к большому числу побочных реакций и более тяжелым их проявлениям, чем во время кампании ликвидации натуральной оспы. Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных антиортопоксвирусных вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с предыдущими поколениями противооспенных вакцин и при этом высокоиммуногенны, обеспечивая надежную защиту от вирусной инфекции.

Первые аттенуированные штаммы ВОВ были получены в результате множественных пассажей вируса на культуре фибробластов куриных эмбрионов (штамм MVA) [6] или культуре клеток почки кролика (штамм LC16m8) [7]. В этих случаях аттенуация вируса была обусловлена спонтанными протяженными делециями и мутациями в вирусном геноме. При этом могут затрагиваться не только гены вирулентности, но и гены, функции которых определяют репликативные свойства вируса и круг чувствительных к нему хозяев [5].

С развитием методов молекулярной биологии стало возможным создавать модифицированные варианты ВОВ путем введения нужных последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения генов самого вируса [8]. Выключение генов вирулентности способно существенно снизить патогенные свойства ВОВ. Одно из наиболее перспективных направлений таких работ – создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов ВОВ, обладающих иммуногенностью и протективностью на уровне классической противооспенной вакцины, но при этом с меньшей патогенностью.

Секвенирование полных геномов различных штаммов и разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов [9–12], накопление данных о функциях многочисленных генов этих вирусов [2, 13, 14], а также разработка методов введения направленных изменений в вирусный геном [15, 16] позволили нам сформулировать и реализовать новый подход к созданию высокоаттенуированных вариантов ВОВ. Этот подход состоит в строго локализованном последовательном удалении или инактивации индивидуальных генов вирулентности, не затрагивающей функции репликации вируса в культуре клеток и не влияющей на круг хозяев, чувствительных к вирусу.

Цель данной работы состояла в создании рекомбинантного варианта ВОВ с пятью нарушенными генами вирулентности, потенциального кандидата на использование в качестве живой аттенуированной вакцины

нового поколения для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, и в изучении биологических свойств этого вируса. Свойства полученного штамма ВОВ 1421ABJCN, такие, как репродукция на перевиваемых культурах клеток млекопитающих, патогенность для мышей и кроликов, специфичная иммуногенная активность, защита экспериментальных животных от инфицирования летальными дозами высоковирулентного ортопоксвируса, сравнивали со свойствами родительского штамма LIVP (клонированный вариант). Эти свойства ортопоксвирусной вакцины относятся к одним из важнейших, изучаемых при проведении доклинических исследований новых вакцин [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии, вирусы, культуры клеток

В работе использовали бактериальные штаммы *Escherichia coli* JM109 и XL2-blue, а также штамм LIVP ВОВ (производный штамма Lister, полученный в Институте вирусных препаратов, Москва) и штамм К-1 вируса экстремелии (ВЭ) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1, Vero и 4647 из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Плазмиды интеграции

Плазмиды интеграции, предназначенные для делегирования целевых генов ВОВ, получены на основе векторной плазмиды pMGC20-gpt, несущей селективный ген *gpt* *E. coli* под контролем 7.5K-промотора ВОВ [16] (рис. 1). Методом ПЦР получали два фрагмента генома ВОВ (штамм LIVP), фланкирующие делегируемый ген слева (L-flank) и справа (R-flank) (рис. 1, 2). В плазмиду pMGC20-gpt встраивали одновременно оба фланкирующих фрагмента ДНК для каждого гена, расщепленных после ПЦР соответствующими эндонуклеазами рестрикции, сайты узнавания которых были введены в нуклеотидную последовательность ПЦР-праймеров (рис. 2). Структура плазмид pΔB8R, pΔC3L, pΔA56R и pΔN1L подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием.

Ранее полученная плаزمида pΔTK содержит последовательность MCS, приводящую к инактивации вирусного гена тимидинкиназы (*J2R*) в результате сдвига рамки трансляции [18].

Получение ВОВ с делецией/нарушением генов вирулентности

ВОВ выращивали в культуре клеток CV-1, используя поддерживающую среду ДМЕМ с добавлением

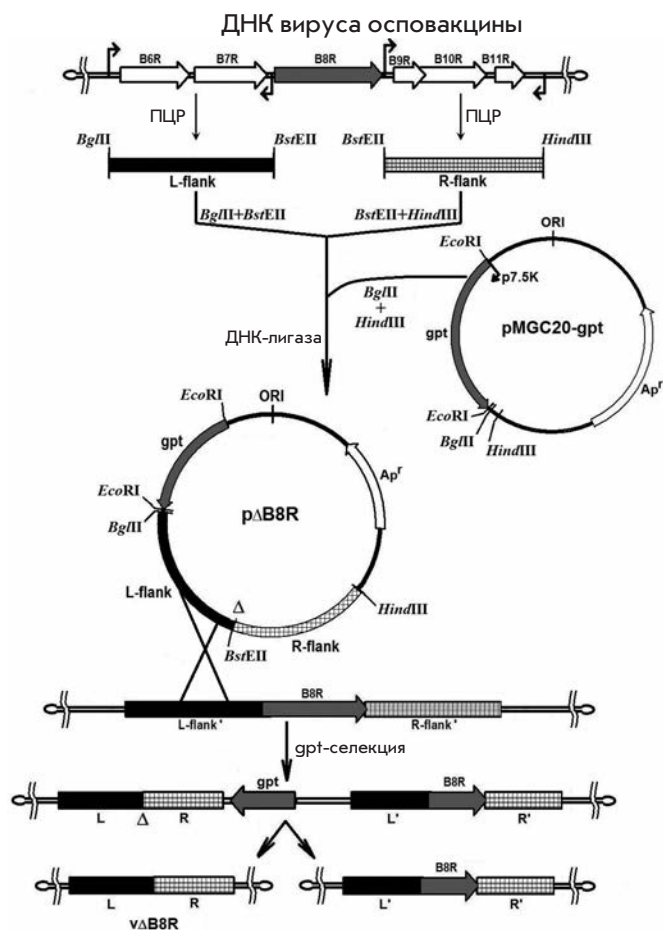


Рис. 1. Общая схема получения ВОВ с направленной делецией гена *B8R* (пояснения в тексте)

2% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота. Все мутантные варианты ВОВ получали методом временной доминантной селекции, описанным ранее [16]. После четырех-пяти пассажей в условиях селекции (до получения ЦПД) вирус клонировали через бляшку под агарозным покрытием [19]. Далее эти клоны подращивали в неселективных условиях и клонировали повторно. ДНК из отобранных клонов рекомбинантных ВОВ выделяли согласно [15]. По результатам ПЦР отбирали по одному реклону от двух-трех клонов, подращивали на культуре CV-1, титровали методом бляшек [19].

ПЦР-анализ ДНК рекомбинантных вирусов

В ДНК клонов рекомбинантных ВОВ методом ПЦР выявляли целевые делеции/инсерции с использованием соответствующих пар олигонуклеотидных праймеров.

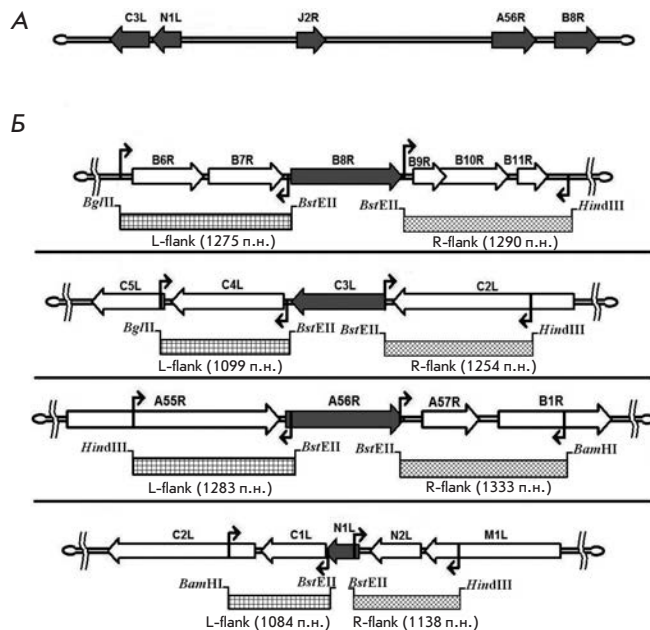


Рис. 2. Схема получения ПЦР-фрагментов ДНК, фланкирующих делелируемые гены ВОВ. А – схема генома ВОВ, на которой стрелками показано расположение генов вирулентности *C3L*, *N1L*, *J2R*, *A56R*, *B8R*; Б – схема расположения ПЦР-фрагментов ДНК ВОВ (заштрихованные блоки), фланкирующие слева (L-flank) и справа (R-flank) делелируемые гены (серые блочные стрелки). Черными ломаными стрелками обозначены места расположения олигонуклеотидных праймеров для ПЦР, рассчитанных таким образом, чтобы делеция целевого гена не нарушала прилегающие к нему вирусные гены, а амплифицируемые фрагменты были ограничены сайтами гидролиза указанными эндонуклеазами рестрикции

Для $\Delta B8R$:

5'-TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA-3'
5'-CGTGATATACCSTAGCCATAGGCAT-3'.

Для $\Delta C3L$:

5'-TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT-3'
5'-TGTTCTGTGTTCTTTCGGTGA-3'.

Для $\Delta A56R$:

5'-GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA-3'
5'-ATTAACATTCSTAGAATTAATCCCGTCS-3'.

Для $\Delta N1L$:

5'-GGGTTGGATCSTTTACACATAGATСТА-
СТАCAGGCGGAACA-3'
5'-GGGAAAGCTTAATTTGTGAAGATGCCA-
TGТАCTACGCT-3'.

Для J2R-MCS:

5'-ATATGTTCTTTCATGCCTAAACGA-3'

5'-ATGAAGGAGCAAAAAGGTTGTAAC-3'.

ПЦР проводили в 0.2 мл тонкостенных микропробирках (Applied Biosystems, США) в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). В реакции использовали реактивы: SE-буфер для Taq-ДНК-полимеразы, трифосфаты и Taq-ДНК-полимеразу производства фирмы «СибЭнзим» (г. Новосибирск, Россия), стерильную деионизованную воду. ПЦР проводили по программе: 1.5 мин при 94°C; затем 20 циклов: 20 с при 94°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. После последнего цикла пробирки прогревали в течение 5 мин при 72°C. Продукты амплификации хранили при температуре 4°C до проведения электрофоретического анализа.

Определение динамики роста мутантных вариантов ВОВ

Для изучения динамики развития клона 14 исходного ВОВ LIVP и мутантных штаммов с нарушением генов вирулентности 90–100% монослой клеток линий CV-1 или Vero, полученный на шестилуночных планшетах, инфицировали вирусами с множественностью заражения 0.1 БОЕ/кл. Во временных точках 0, 24, 48 и 72 ч после инфицирования титр вируса определяли традиционным методом бляшек.

Наработка и очистка вирусов для инфицирования мышей

Монослой клеток линии 4647, рекомендованной для производства противосспенной вакцины [20], выращенный на культуральных матрасах с ростовой поверхностью 175 см² (объем 650 мл), инфицировали ВОВ с множественностью заражения 1.0 БОЕ/кл. Инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C до образования полного ЦПД, 80% поддерживающей среды удаляли, а в 20% (около 20 мл) получали криолизат (три цикла замораживания–оттаивания) инфицированных клеток, обрабатывали его на ультразвуковом дезинтеграторе типа MSE 500 мощностью 22 кГц 2–3 раза по 10–15 с. От клеточного дебриса освобождались низкоскоростным центрифугированием (10 мин при 4000 g). Супернатант центрифугировали в течение 1.5 ч при 30000 g. Осадок вируса суспендировали в 4 мл физиологического раствора. Инфекционный титр образцов определяли методом бляшек в монослой клеток 4647.

Животные

В зависимости от поставленных задач использовали мышей линии Balb/c, самок весом 14–16 г (возраст 4–5 нед.) или 1–2-дневных сосунков этой же

линии весом 5–6 г. Животных объединяли в группы по 10 особей. Также использовали кроликов породы Шиншилла весом 2.5–3 кг. Все животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Эксперименты с животными проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Оценка вирулентности штаммов ВОВ

Для оценки нейровирулентности штаммов ВОВ 1–2-дневным мышам-сосункам интрацеребрально вводили рекомбинантный ВОВ 1421ABJCN или исходный клоновый вариант 14 ВОВ LIVP, разведенные на физиологическом растворе, в количестве 10² БОЕ/0.01 мл/мышь. Животным контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора. За животными наблюдали в течение 8 сут, учитывали количество погибших.

Для определения репликации вируса в тканях головного мозга мышей-сосунков, инфицированных по аналогичной схеме, подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации через 3 сут после заражения, стерильно извлекли пробы головного мозга. Пробы от животных из одной группы объединяли, готовили 10% тканевые суспензии на среде ДМЕМ по методике, описанной в [21]. Затем определяли титры вирусов традиционным методом бляшек в монослой культуры клеток 4647.

Вирулентность штаммов ВОВ при внутрикожном введении оценивали на кроликах, которым предварительно удаляли шерсть на боках. Делали шесть 10-кратных разведений штаммов ВОВ на физиологическом растворе до содержания 10²–10⁷ БОЕ/0.05 мл, которые вводили животным внутрикожно в указанном выше объеме, каждое разведение – в два отдельных участка кожи. На одном боку животного исследовали ВОВ 1421ABJCN, на другом – исходный ВОВ LIVP. Наблюдение за животными проводили в течение 14 сут. Определяли время появления и заживления инфильтратов в зависимости от титра и от штамма вируса.

Иммуногенность вирусов

Способность вирусов индуцировать выработку специфических антител определяли по вируснейтрализующей активности сывороток крови, инфицируя 4–5-недельных мышей подкожно вирусами 1421ABJCN или LIVP в дозах 10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/0.1 мл/мышь. Мышам контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора, на котором готовили разведения вируса. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 28

сут. Через 28 сут после второй иммунизации (через 56 сут после первой) у предварительно наркотизированных мышей отбирали пробы крови из ретробульбарного венозного сплетения, инкубировали их при 4°C в течение 24 ч для формирования фибринового сгустка. Сывороточную фракцию отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 5000 *g*. Препараты сывороток каждой группы объединяли и прогревали при 56°C в течение 30 мин для инактивации системы комплемента. Титр вируснейтрализующих антител определяли на культуре клеток 4647 согласно [22].

Протективность штаммов ВОВ

Способность вирусных штаммов формировать защитный иммунитет против ортопоксвирусной инфекции определяли на 4–5-недельных мышах, иммунизированных дважды по схеме эксперимента по изучению иммуногенности штаммов ВОВ. Через 28 сут после второй иммунизации животных в состоянии легкого эфирного наркоза подвергали интраназальной инокуляции высокопатогенным для мышей ВЭ в дозе 10 LD₅₀/0.02 мл/мышь согласно [23]. Наблюдение за животными вели в течение 14 дней, учитывая количество выживших и погибших животных.

Анализ данных

Экспериментальные данные оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента и программы Origin Professional 8.1.10.86. Статистически значимой считали величину *P* < 0.05 [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение клонового варианта вируса осповакцины

Перед этапом рекомбинационной интеграции плазмид в вирусный геном клонировали исходный штамм LIVP ВОВ методом предельного разведения через бляшку из-под агарозного покрытия [19], чтобы избежать возможной внутриштаммовой гетерогенности вируса при последующем отборе индивидуальных рекомбинантных клонов. Были отобраны пять клоновых вариантов ВОВ, из которых выделяли ДНК и анализировали ее с использованием эндонуклеазы рестрикции HindIII. Для дальнейшей работы выбрали клоновый вариант 14, не отличающийся по рестрикционной картине ДНК от исходного штамма LIVP ВОВ.

Создание рекомбинантных ВОВ с направленными генами вирулентности

Для последовательной инактивации были выбраны гены γ -интерферонсвязывающего белка (*B8R*), ком-

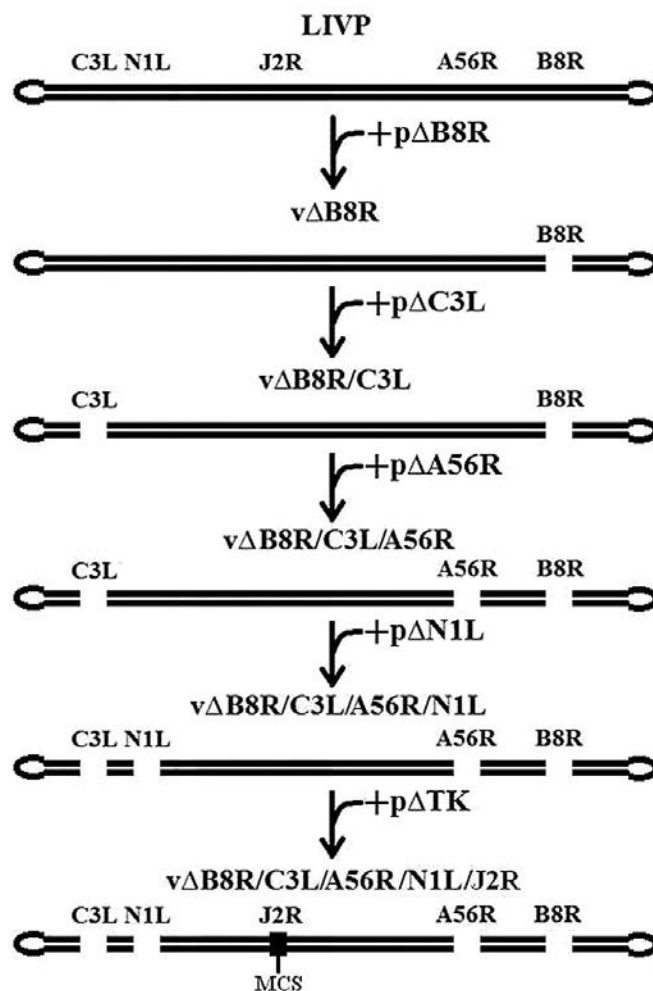


Рис. 3. Схема получения рекомбинантного ВОВ с пятью инактивированными генами вирулентности. Показано как последовательно с использованием соответствующих плазмид интеграции делеции/инсерции направленно вводили в выбранные вирусные гены

плементсвязывающего белка (*C3L*), гемагглютинаина (*A56R*), ингибитора апоптоза (*N1L*) и тимидинкиназы (*J2R*) ВОВ (рис. 2А). Использованы плазмиды интеграции *pΔB8R*, *pΔC3L*, *pΔA56R*, *pΔN1L* и *pΔTK*, обеспечивающие направленную инактивацию нужных генов.

На первом этапе работы монослой клеток CV-1 инфицировали клоновым вариантом 14 ВОВ LIVP и трансфицировали рекомбинантной плазмидой *pΔB8R* в условиях *gpt*-селекции рекомбинантов ВОВ. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образовался рекомбинантный вирусный геном, содержащий как селективный ген *gpt*, так и сегмент вирусного генома с целевой делецией и этот же сегмент без делеции. Такая генетическая конструкция нестабильна, она

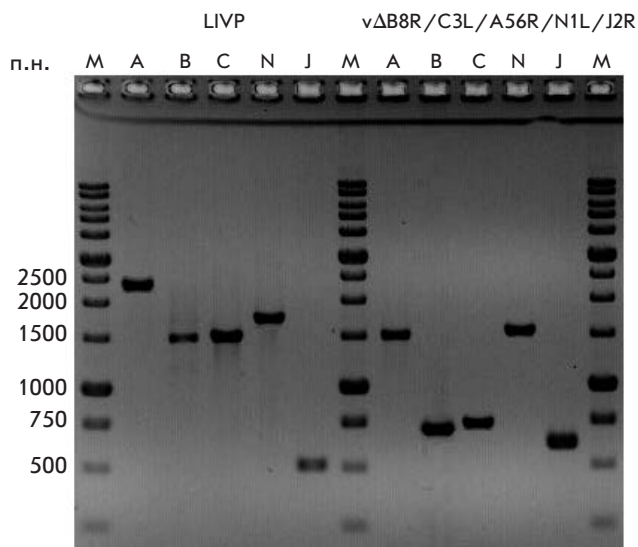


Рис. 4. Анализ наличия целевых делеций/инсерций в продуктах ПЦР-амплификации ДНК ВОВ. Электрофореграмма разделения в 1% агарозном геле фрагментов ДНК ВОВ, полученных в результате ПЦР исходного родительского клона 14 ВОВ LIVP и рекомбинантного ВОВ с делециями пяти генов вирулентности – 1421ABJCN (см. пояснения в тексте). М – ДНК-маркер, длина фрагментов приведена слева. Дорожки А, В, С, N, J – фрагменты ДНК ВОВ, полученные в результате ПЦР с соответствующими парами праймеров на гены *A56R*, *B8R*, *C3L*, *N1L*, *J2R*

может существовать лишь под селективным давлением [15, 16]. После снятия селективного давления по гену *gpt* и внутримолекулярной рекомбинации по районам R-R' образовывался рекомбинантный вирус *vΔB8R* (рис. 1). Клоны данного варианта вируса выявляли ПЦР-анализом вирусной ДНК (см. «Экспериментальную часть», данные не приведены).

Один из отобранных клонов рекомбинантного ВОВ использовали на следующем этапе для удаления гена *C3L*. В результате получили вариант ВОВ с делециями двух генов – *B8R* и *C3L*, а затем последовательно трех и четырех генов и с одновременно нарушенными пятью генами вирулентности (*vΔB8R/C3L/A56R/N1L/J2R*, рис. 3). Последний вариант рекомбинантного вируса сокращенно обозначили как 1421ABJCN.

Делеции/инсерции в районе каждого гена ВОВ выявляли с использованием ПЦР с соответствующими парами праймеров (см. «Экспериментальную часть»). На рис. 4 представлены результаты ПЦР-анализа ДНК рекомбинантного вируса 1421ABJCN с нарушением пяти генов вирулентности. ПЦР-фрагменты, соответствующие полноразмерным копиям генов *A56R*,

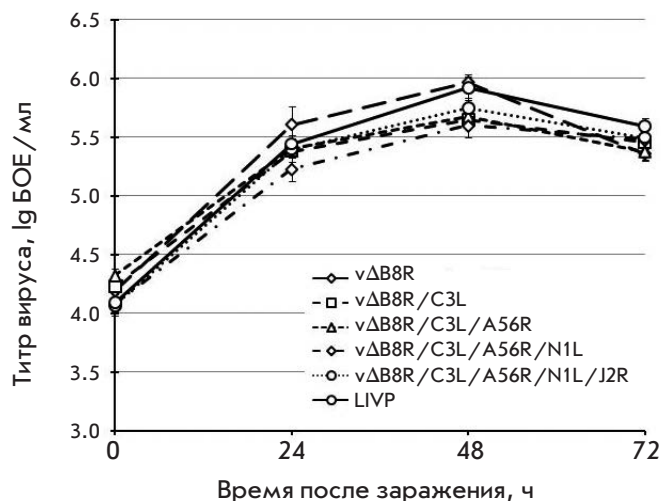


Рис. 5. Сравнительный анализ динамики размножения вариантов ВОВ в культуре клеток линии CV-1

B8R, *C3L*, *N1L* и *J2R*, у исходного вируса LIVP имели длину 2366, 1555, 1542, 1784 и 512 п.н. соответственно, а ПЦР-фрагменты, соответствующие делеционным вариантам генов $\Delta A56R$, $\Delta B8R$, $\Delta C3L$, $\Delta N1L$ и инсерционному варианту *J2R-MCS* вируса 1421ABJCN, составляли 1425, 737, 751, 1431 и 617 п.н. соответственно, что совпадало с расчетными величинами.

Эффективность размножения мутантных вариантов ВОВ в культурах клеток млекопитающих

При создании современной высокоаттенуированной вакцины важно, чтобы получаемый вариант вируса сохранил репродуктивные свойства на культурах клеток. Поэтому на первом этапе изучения биологических свойств сконструированных рекомбинантных вариантов ВОВ оценили эффективность их репликации в культурах клеток CV-1, Vero и 4647. На этих культурах клеток определяли титр вирусов в динамике развития инфекционного процесса для ВОВ с нарушением как одного гена, так и двух, трех, четырех и пяти генов вирулентности. Результаты таких экспериментов на культуре клеток CV-1, приведенные на рис. 5, показали, что кривые размножения рекомбинантных вирусов не различаются статистически значимо между собой, а также не отличаются от исходного ВОВ LIVP. Сходные данные зарегистрированы и при выращивании указанных выше вариантов ВОВ на культурах клеток линий Vero и 4647.

Показано, что рекомбинантные варианты ВОВ жизнеспособны и стабильно сохраняют генотип в течение 10 пассажей на культурах клеток CV-1 и 4647.

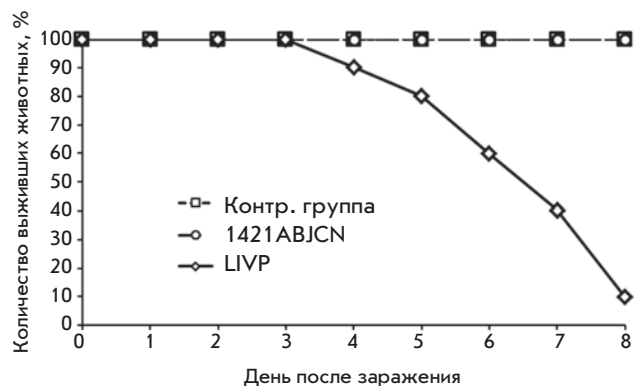


Рис. 6. Динамика гибели новорожденных мышей при интрацеребральном заражении штаммами 1421ABJCN и L1VP ВОВ

Нейровирулентность вариантов ВОВ

Способность вирусов вызывать гибель при интрацеребральном заражении изучали на новорожденных мышках, за которыми вели наблюдение в течение 8 дней после инфицирования. В группе животных, зараженных ВОВ L1VP в дозе 10^2 БОЕ/мышь, гибель началась с 4-х суток, а смертность на конец экспе-

римента составила 90%. В группе мышей, инфицированных такой же дозой ВОВ 1421ABJCN, гибель животных за время эксперимента не наблюдали (рис. 6).

Кроме того, определяли титр вирусов в мозге инфицированных сосунков на 3-и сутки после интрацеребрального заражения. Выявлено значительное снижение эффективности размножения в мозге мышей штамма 1421ABJCN (титр вируса \pm стандартное отклонение: 2.78 ± 0.66 lg БОЕ/г органа) в сравнении с исходным штаммом ВОВ L1VP (6.12 ± 0.20 lg БОЕ/г органа).

Патогенность для кроликов

Оценивали воспалительно-некротические проявления на эпилированной коже кроликов после внутрикожного введения вирусных препаратов. ВОВ 1421ABJCN вызывал воспалительную реакцию лишь начиная с дозы 10^5 БОЕ/инъекцию, в то время как родительский ВОВ L1VP – с наименьшей использованной дозы 10^2 БОЕ/инъекцию (таблица). Воспалительно-некротические проявления от 1421ABJCN были менее выражены по сравнению с ВОВ L1VP. Полное заживление инфильтратов, вызванных рекомбинантным вариантом 1421ABJCN, наступало на 9-е сутки от момента заражения, а не-

Сравнение воспалительно-некротических показателей штаммов ВОВ при внутрикожном инфицировании кроликов

День после заражения	Титр вируса, БОЕ/инъекцию											
	1421ABJCN						L1VP					
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
1	-	-	-	-	В	В	-	-	-	В	В	В
	-	-	-	В	В	В	-	-	-	В	В	В
2	-	-	-	-	В	В	-	-	В	В	В	В/Н
	-	-	-	В	В	В	-	-	В	В	В	В/Н
3	-	-	-	-	В	В/Н	В	В	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	В	В/Н	В/Н	В	В	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
6	-	-	-	-	Н	Н	-	-	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	Н	Н	-	-	-	В/Н	В/Н	В/Н
7	-	-	-	-	-	Н	-	-	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	-	Н	-	-	-	-	В/Н	В/Н
9	-	-	-	-	-	Н	-	-	Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	-	Н	-	-	-	-	В/Н	В/Н
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	Н	В/Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	В/Н
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	Н	Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. В – воспаление, Н – некроз. Кожные поражения детектировали в двух независимых повторах для каждой дозы вируса.

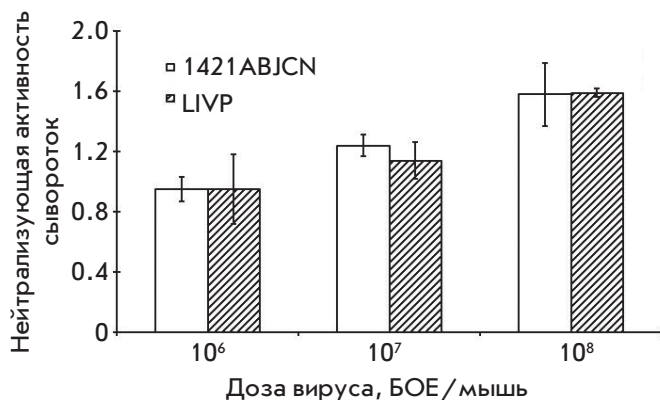


Рис. 7. Уровни ВОВ-нейтрализующей активности сывороток, полученных после двукратной подкожной иммунизации мышей штаммами 1421ABJCN и LIVP в различных дозах. Титры вируснейтрализующих антител рассчитывали как -lg от наибольшего разведения сыворотки, при котором достигается 50% нейтрализация ВОВ ± стандартное отклонение

крозы, вызванные исходным штаммом LIVP, проходили лишь к 14-м суткам.

Иммуногенная активность штаммов ВОВ

Иммуногенность вариантов ВОВ оценивали по уровню индуцируемых ими вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после второй иммунизации. Иммунизацию проводили дозами вирусов 10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/мышь. Как видно из данных, приведенных на рис. 7, рекомбинантный штамм 1421ABJCN при подкожной иммунизации животных вызывает наработку вируснейтрализующих антител, на уровне, сопоставимом с уровнем антител индуцируемых родительским ВОВ LIVP. Это свидетельствует о том, что аттенуированный вариант ВОВ обладает иммуногенной активностью, характерной для исходного штамма ВОВ LIVP. Сыворотки, полученные от мышей контрольной группы, не обладали детектируемой ВОВ-нейтрализующей активностью.

Защитные свойства вариантов ВОВ

Оценку протективных свойств штаммов ВОВ проводили на мышах, дважды подкожно иммунизированных разными дозами вирусов (10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/мышь), которых затем интраназальным путем заражали высокопатогенным для мышей ВЭ в дозе 10 LD₅₀/мышь. Наблюдение за мышами вели в течение 2 нед., учитывая процент выживших животных. Результаты этих экспериментов (рис. 8) показали полную защиту животных при иммунизации

как штаммом 1421ABJCN, так и ВОВ LIVP при всех использованных дозах вирусов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* включает такие патогенные для человека виды, как ВНО, ВОО, ВОК и ВОВ. ВНО вызывает одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, унесшее в свое время миллионы жизней [1]. ВНО в процессе своей эволюции сузил круг чувствительных хозяев до одного вида – человека. Отсутствие другого природного резервуара (чувствительных животных), а также наличие высокоэффективной противооспенной вакцины на основе ВОВ позволило успешно реализовать международную программу по глобальной ликвидации оспы [1, 2].

Прекращение после 1980 года противооспенной вакцинации привело к постепенной утрате человеческой популяцией иммунитета к ВНО и другим ортопоксвирусам, патогенным для человека [4]. Это повышает опасность возрождения и более широкого распространения среди людей ортопоксвирусных инфекций, возбудители которых потенциально могут эволюционировать ко все более патогенным и эпидемически опасным вариантам [3].

Для создания высокоаттенуированного варианта ВОВ, который может быть использован в качестве антиортопоксвирусной вакцины и/или онколитического вируса, в нашей работе реализован подход последовательного удаления/инактивации генов различных молекулярных факторов вирулентности. По результатам анализа опубликованных данных в качестве перспективных генов нами выбраны гены ВОВ: *B8R*, *C3L*, *A56R*, *N1L* и *J2R*.

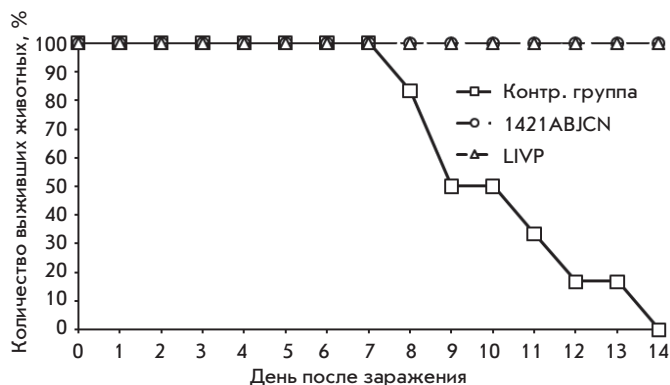


Рис. 8. Динамика гибели мышей, дважды иммунизированных штаммами 1421ABJCN или LIVP ВОВ в дозе 10⁶ БОЕ/мышь, после заражения ВЭ в дозе 10 LD₅₀/мышь

Ген *B8R* ВОВ кодирует гликопротеин, секретлируемый из зараженной клетки в виде гомодимера на ранней стадии развития инфекции. Этот белок имеет сходство по аминокислотной последовательности с внеклеточным доменом клеточного рецептора γ -интерферона (гИФН), связывается и ингибирует активность гИФН у широкого круга млекопитающих [25]. Удаление гена *B8R* приводило к аттенуации ВОВ по сравнению с вирусом дикого типа на мышинных моделях [26], вызывая меньшую заболеваемость даже при высоких дозах [27].

Ген *C3L* кодирует комплементсвязывающий белок (КСБ), секретлируемый в больших количествах инфицированной клеткой на раннем этапе вирусной инфекции [28] и ингибирующий активность системы комплемента через взаимодействие с C3b и C4b [14, 29]. КСБ ингибирует воспалительные реакции [30] и антитело-зависимую нейтрализацию вирионов ВОВ, усиленную комплементом [31]. В опытах на животных мутанты ВОВ, лишенные КСБ, обладали сниженной вирулентностью [14, 31].

Раннепоздний ген *A56R* кодирует гемагглютинин – поверхностный гликопротеин, обеспечивающий способность вируса присоединяться к клетке-хозяину, а также ингибирующий слияние инфицированных клеток и протеолитически активирующий инфекционность вирионов. Показано, что делеция гена *A56R* у штамма NYCBH ВОВ вызывает снижение величины LD_{50} приблизительно на 4 порядка при интрацеребральном и интраназальном введении мышам по сравнению с родительским штаммом [32]. Показано также, что нарушение гена гемагглютинина приводит к значительной аттенуации ВОВ штамма WR [33].

Ген *N1L* относится к группе раннепоздних генов ВОВ. Он несуществен для размножения вируса *in vitro*, но важен для проявления вирулентности *in vivo*. Продукт этого гена представляет собой внутриклеточный гомодимер [34]. Белок N1 относится к семейству Vcl-2-подобных белков [35], ингибирует как апоптоз, так и активацию провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B (nuclear factor kappa B) [36].

Ранний ген *J2R* ВОВ кодирует вирусную тимидинкиназу. Показано, что нарушение гена тимидинкиназы ВОВ значительно снижает вирулентность вируса *in vivo* [37, 38].

Для получения запланированных вариантов ВОВ разработана схема направленной инактивации целевых вирусных генов (рис. 1, 2). Последовательно в состав генома клонового варианта 14 ВОВ LIVP вводили делеции/инсерции целевых генов (рис. 3). Изменения в геноме ВОВ с пятью инактивированными генами вирулентности подтверждены ПЦР-анализом (рис. 4) и секвенированием.

Поскольку задача нашей работы состояла в создании высокоаттенуированной вакцины без утраты функций репликации ВОВ на культурах клеток млекопитающих, проанализировали эффективность размножения полученных вариантов ВОВ на линиях клеток CV-1, Vero и 4647. Оказалось, что как ВОВ с нарушением выбранных единичных генов, так и варианты с одновременной инактивацией нескольких генов вирулентности не уступали исходному ВОВ LIVP в эффективности размножения на изученных культурах клеток (рис. 5). Полученные результаты позволяют заключить, что удаление/нарушение выбранных генов вирулентности не влияет на продуктивные свойства созданных вариантов ВОВ на культурах клеток млекопитающих, что важно для наработки вакцины.

Считается, что неврологические осложнения при противооспенной вакцинации обусловлены инфицированием ВОВ мозга человека и развитием вследствие этого энцефалита. Поэтому важнейшая характеристика вакцинного штамма ВОВ – его нейровирулентность, тестируемая обычно при интрацеребральном заражении новорожденных мышей [39, 40]. Вакцинный штамм ВОВ LIVP, введенный в дозе 10^2 БОЕ/мышь, приводил за 8 сут наблюдения к гибели 90% экспериментальных животных, в то время как полученный на его основе штамм 1421ABJCN при той же дозе интрацеребрального заражения вирулентных свойств не проявил (рис. 6). Оценка накопления вируса в мозге новорожденных мышей на 3-й день после инфицирования показала, что рекомбинантный ВОВ 1421ABJCN размножается в мозге мышей в 1000 раз менее эффективно по сравнению с родительским штаммом ВОВ LIVP.

При внутрикожном заражении кроликов обнаружено также, что ВОВ 1421ABJCN как минимум на 2 порядка менее вирулентен, чем родительский ВОВ LIVP (таблица).

Оба изучаемых вируса при подкожной иммунизации мышей индуцировали сравнимый по уровню синтез специфичных вируснейтрализующих антител (рис. 7) и обеспечивали полную защиту животных от высоковирулентного для мышей ортопоксвируса ВЭ (в дозе $10 LD_{50}$ /мышь) даже при минимальной использованной иммунизирующей дозе ВОВ 10^6 БОЕ/мышь (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами генетической инженерии получен эффективно размножающийся в культурах клеток млекопитающих штамм ВОВ 1421ABJCN с пятью направленно-инактивированными генами вирулентности. Реактогенность и нейровирулентность у рекомбинантного ВОВ 1421ABJCN значительно

снижены по сравнению с родительским штаммом ВОВ LIVP, используемым в России для вакцинации людей. При этом ВОВ 1421ABJCN сохранил иммуногенные и протективные свойства исходного штамма LIVP. Такой вирус может составить основу живой аттенуированной противороптопоксвирусной вакцины нового поколения, а также служить вектором для создания безопасных живых рекомбинантных поливалентных вакцин и/или онколитических вирусов. ●

*Авторы выражают благодарность
П.Ф. Сафронову и И.Н. Бабкиной
за конструирование плазмид интеграции.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Федеральной целевой программы
«Национальная система химической
и биологической безопасности (2009–2014 годы)»,
а также Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 15-04-01326а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F, Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
2. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2005. 425 p.
3. Shchelkunov S.N. // PLoS Path. 2013. V. 9. № 12. e1003756.
4. Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29. Suppl. 4. D49–D53.
5. Artenstein A.W., Grabenstein J.D. // Expert Rev. Vaccines. 2008. V. 7. P. 1225–1237.
6. Mayr A., Stickl H., Muller H.K., Danner K., Singer H. // Zentralbl. Bakteriologie. 1978. V. 167. P. 375–390.
7. Kenner J., Cameron F., Empig C., Jobs D.V., Gurwith M. // Vaccine. 2006. V. 24. P. 7009–7022.
8. Mos B. // Vaccine. 2013. V. 31. P. 4220–4222.
9. Shchelkunov S.N., Massung R.F., Esposito J.J. // Virus Res. 1995. V. 36. P. 107–118.
10. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // Virology. 1998. V. 243. P. 432–460.
11. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Loparev V.N., Safronov P.F., Gutorov V.V., Chizhikov V.E., Knight J.C., Parsons J.M., Massung R.F., Esposito J.J. // Virology. 2000. V. 266. P. 361–386.
12. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., Mikheev M.V., Gutorov V.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Babkin I.V., Uvarova E.A., Sandakhchiev L.S., et al. // Virology. 2002. V. 297. P. 172–194.
13. Shchelkunov S.N. // Virus Genes. 2010. V. 41. P. 309–318.
14. Shchelkunov S.N. // Adv. Virol. 2012. V. 2012. 524743.
15. Falkner F.G., Moss B. // J. Virol. 1990. V. 64. P. 3108–3111.
16. Kochneva G., Kolosova I., Maksyutova T., Ryabchikova E., Shchelkunov S. // Arch. Virol. 2005. V. 150. P. 1857–1870.
17. Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты), часть вторая. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2012. 536 с.
18. Максютов Р.А., Трегубчик Т.В., Денисова Н.И., Максютов А.З., Гаврилова Е.В. // Рос. иммунол. журн. 2013. Т. 4. С. 456–459.
19. Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. 344 с.
20. Скарнович М.О., Радаева И.Ф., Вдовиченко Г.В., Нечаева Е.А., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Плясунов И.В., Шишкина Л.Н., Терновой В.А., Сметанникова М.А. и др. // Вопр. вирусол. 2007. Т. 2. С. 37–40.
21. Vijaysri S., Jentarra G., Heck M.C., Mercer A.A., McInnes C.J., Jacobs B.L. // Vaccine. 2008. V. 26. P. 664–676.
22. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M. // J. Clin. Virol. 2005. V. 32. P. 47–52.
23. Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2000. V. 124. P. 362–377.
24. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 186 с.
25. Mossman K., Upton C., Buller R.M., McFadden G. // Virology. 1995. V. 208. P. 762–769.
26. Verardi P.H., Jones L.A., Aziz F.H., Ahmad S., Yilma T.D. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 11–18.
27. Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. // J. Gene Med. 2006. V. 7. P. 814–823.
28. Kotwal G.J., Isaacs S.N., McKenzie R., Frank M.M., Moss B. // Science. 1990. V. 250. P. 827–830.
29. Sahu A., Isaacs S.N., Soulika A.M., Lambris J.D. // J. Immunol. 1998. V. 160. P. 5596–5604.
30. Miller C.G., Shchelkunov S.N., Kotwal G.J. // Virology. 1997. V. 229. P. 126–133.
31. Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 628–632.
32. Lee M.S., Roos J.M., McGuigan L.C., Smith K.A., Cormier N., Cohen L.K., Roberts B.E., Paynet L.G. // J. Virol. 1992. V. 66. P. 2617–2630.
33. Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R., et al. // J. Virol. 1988. V. 62. P. 4474–4480.
34. Bartlett N.W., Symons J.A., Tschärke D.C., Smith G.L. // J. Gen. Virol. 2002. V. 83. P. 1965–1976.
35. Cooray S., Bahar M.W., Abrescia N.G., McVey C.E., Bartlett N.W., Chen R.A., Stuart D.I., Grimes J.M., Smith G.L. // J. Gen. Virol. 2007. V. 88. P. 1656–1666.
36. Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. // PLoS Path. 2011. V. 7. e1002430.
37. Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B. // Nature. 1985. V. 317. P. 813–815.
38. Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. // J. Gen. Virol. 1991. V. 72. P. 125–130.
39. Li Z., Rubin S.A., Taff R.E., Merchlinsky M., Ye Z., Carbone K.M. // Vaccine. 2004. V. 22. P. 1486–1493.
40. Zhang C.X., Sauder C., Malik T., Rubin S.A. // Biologicals. 2010. V. 38. P. 278–283.

УДК 577.322.75

Роль липидного окружения в процессе димеризации трансмембранных доменов гликофорина А

А. С. Кузнецов¹, П. Е. Волынский¹, Р. Г. Ефремов^{1-3*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20³Межведомственный суперкомпьютерный центр РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 32а

*E-mail: r-efremov@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.09.2015

РЕФЕРАТ Разработан эффективный вычислительный подход к количественной оценке свободной энергии спонтанной ассоциации α -спиралей белков в мембранном окружении. В основе подхода – численное разложение профилей свободной энергии взаимодействия трансмембранных (ТМ) спиралей на компоненты, соответствующие взаимодействиям белок–белок, белок–липиды и белок–вода. Метод апробирован для ТМ-сегментов гликофорина А человека (GrA) и двух его мутантных форм Gly83Ala и Thr87Val. Показано, что липиды вносят значительный отрицательный вклад в свободную энергию димеризации, в то время как образующиеся на интерфейсе спираль–спираль контакты аминокислотных остатков могут быть невыгодными. Детальный баланс различных энергетических вкладов сильно зависит от аминокислотной последовательности ТМ-сегмента белка. Данные о доминирующей роли среды во взаимодействии мембранных белков меняют представления о движущей силе спонтанной ассоциации ТМ α -спиралей. Адекватная количественная оценка вклада водно-липидного окружения, таким образом, становится чрезвычайно актуальной при рациональном конструировании новых молекул, способных заданным образом модулировать работу битопных мембранных белков, включая рецепторные тирозинкиназы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белок-белковые взаимодействия, гликофорин А, молекулярная динамика, роль липидной мембраны, свободная энергия межмолекулярных взаимодействий, трансмембранный домен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GrA – гликофорин А человека; МБ – мембранные белки; МД – молекулярная динамика; ПОФХ – пальмитоиллолеилфосфатидилхолин; РТК – рецепторная тирозинкиназа; СКО – среднеквадратичное отклонение; ТМ – трансмембранный.

ВВЕДЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия играют важную роль в формировании супрамолекулярных комплексов, выполняющих важнейшие функции в клетке. Изучение этих взаимодействий особенно затруднено в случае мембранных белков (МБ), так как они теряют свои нативные свойства в немембранном окружении. Поскольку наиболее часто встречающимся структурным элементом в трансмембранных (ТМ) доменах МБ является α -спираль, то в ряде случаев исследование белок-белковых взаимодействий сводится к изучению поведения ТМ α -спиралей в мембране. Именно оно определяет пространственную структуру мембраносвязанных участков ионных каналов [1–4] и функционирование битопных (т.е. имеющих лишь одну ТМ-спираль) мембранных белков, в частности рецепторных тирозинкиназ (РТК) [5–9]. Показано,

что для активации РТК необходимо формирование димеров или олигомеров, причем в процессе ассоциации участвуют именно ТМ-домены [6, 10–12]. В случае нарушения работы этих МБ развиваются серьезные заболевания, такие, как сахарный диабет или рак, поэтому их исследование особенно важно. Показано, что ряд нарушений работы РТК связан непосредственно с мутациями в ТМ-доменах [13–16]. Перспективной представляется разработка терапевтических агентов, так называемых «пептидов-перехватчиков», селективно действующих на ТМ-сегменты белка-мишени, однако для решения этой задачи необходимо понимание всех деталей молекулярного механизма передачи сигнала через эти домены целевых РТК [17–20]. Таким образом, взаимодействие α -спиралей в мембране является ключевым процессом, детали которого еще требуют подробного изучения.

Среди экспериментальных методов исследования взаимодействия ТМ-доменов можно выделить использование гибридных молекулярно-биологических конструкций с белками-маркерами, например FRET [21] и ТОХСАТ [22], а также определение пространственной структуры димеров методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса в средах, имитирующих мембранное окружение [5, 23–25]. Обе группы подходов дают хорошие результаты, однако они связаны со сложными и длительными процессами экспрессии и наработки целевых белков, а также с трудностями стабилизации олигомерных состояний в мембраноподобном окружении. Поэтому для решения задачи все чаще используют методы компьютерного моделирования, позволяющие эффективно оценивать параметры белковых комплексов. В частности, для изучения роли среды и влияния мутаций на димеризацию ТМ-доменов МБ используют метод оценки свободной энергии ассоциации с применением расчетов молекулярной динамики (МД) [11, 12, 26, 27].

На основании результатов анализа аминокислотных последовательностей ТМ-доменов ряда МБ, в частности гликофорина А (GpA), предложена концепция «мотивов димеризации», характерных остатков, которые располагаются в области контакта и определяют взаимодействие между α -спиралями [28–31]. Так называемый «гликофоринный» мотив димеризации включает два остатка глицина, разделенных в последовательности тремя другими остатками, и обозначается GG4. Этот мотив обнаружен и у других белков [5], однако в некоторых случаях он оказывался нефункциональным [9]. Гликофорин до сих пор считается хорошей моделью для теоретического и экспериментального изучения влияния точечных мутаций и свойств среды на димеризацию ТМ-спиралей [27, 29, 32–34]. Несмотря на то что в рассматриваемых работах ключевая роль в формировании димера отводится белок-белковым взаимодействиям, показано, что на димеризацию оказывают влияние параметры липидной мембраны [35–37]. Эти различия объясняли работой принципа гидрофобного соответствия, когда для наиболее эффективного встраивания белка в мембрану длина области гидрофобных остатков в спирали должна быть равна толщине гидрофобной области липидного бислоя [38].

Известно, что липидная мембрана не является гомогенной средой, а склонна к формированию кластеров липидов даже в простейших модельных системах [39, 40]. Белки же, в свою очередь, часто содержат на своей поверхности сайты связывания молекул фосфолипидов и холестерина, которые могут модулировать их активность [4, 21, 41, 42]. Встраивание

любого белка в мембрану вызывает изменение ее свойств [43, 44], а процесс димеризации может индуцировать более сложные эффекты [40, 45]. Таким образом, взаимодействие ТМ-доменов МБ не ограничивается лишь поиском наиболее выгодных белок-белковых контактов, а представляет собой сложную комбинацию вкладов взаимодействий белков и среды.

Следовательно, возникает вопрос о количественной оценке вклада эффектов мембранной среды в свободную энергию димеризации ТМ-доменов белка. Более того, необходимо установить роль каждого аминокислотного остатка в данном процессе. Важную информацию можно получить, изучая воздействие точечных мутаций в аминокислотной последовательности на распределение вкладов в энергию белка и окружения. В настоящей работе изучено влияние двух мутаций в ТМ-доме GpA на процесс формирования димера. Были выбраны замены, влияющие на разные факторы димеризации: мутация Gly83Ala, нарушающая плотную упаковку спиралей, и Thr87Val, делающая невозможной образование межмолекулярной водородной связи. Для изучения на атомарном уровне применяли метод МД в явно заданном цвиттер-ионном липидном бислое. Полученные результаты позволяют сделать вывод о доминирующей роли мембраны на начальном этапе формирования димера и о различных молекулярных механизмах нарушения ассоциации ТМ-комплексов в мутантных белках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые системы

Для исследования выбрали две мутации, затрагивающие наиболее важные для димеризации аминокислотные остатки ТМ-домена гликофорина А: Gly83Ala и Thr87Val [46, 47]. Аминокислотные последовательности пептидов приведены в табл. 1. Мономеры и димеры ТМ-домена изучали в гидратированных липидных бислоях из пальмитоилолеилфосфатидилолина (ПОФХ). В мономерах белок представляли

Таблица 1. Аминокислотные последовательности исследуемых пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность
GpA	SEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRR
GpA Thr87Val	SEPEITLIIFGVMAGVIGVILLISYGIRR
GpA Gly83Ala	SEPEITLIIFGVMAAVIGTILLISYGIRR

Примечание. Подчеркнуты замены аминокислотных остатков. Курсивом выделены концевые остатки, влияние которых не учитывали при расчете профилей энергии белок-белкового взаимодействия.

в виде идеальной α -спирали; начальную конформацию димера строили на основании экспериментальной структуры димера GrA дикого типа (PDB ID: 2KPF [48]). Модели димеров мутантных форм GrA строили по гомологии, заменяя соответствующие остатки, с последующей энергетической релаксацией структуры. Модели белка помещали в липидный бислой (128 молекул ПОФХ), добавляли молекулы воды с помощью утилиты *genbox*. Размер расчетной ячейки составлял $6.5 \times 6.5 \times 7.5$ нм³.

Молекулярная динамика

Траектории МД рассчитывали с использованием программного пакета GROMACS версии 4.6.7 и силового поля GROMOS96 43a2 [49]. Шаг интегрирования составлял 2 фс, использовали периодические граничные условия по всем направлениям. Расчет производили при постоянном давлении 1 атм и температуре 315 К. Давление в системе контролировали с помощью алгоритма баростата Берендсена [50]. Применяли отдельные схемы термостатирования для белка, липидов и воды, алгоритм V-rescale [51]. Электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием суммирования по Эвальду, ван-дер-ваальсовы взаимодействия – потенциала Леннарда–Джонса с двойной отсечкой на расстоянии 1.0/1.2 нм.

Перед расчетом траектории МД проводили минимизацию энергии системы методом наискорейшего спуска (50000 шагов), а затем в течение первых 50 пс МД температуру в системе линейно повышали с 5 до 315 К. Для релаксации мембранного окружения сначала рассчитывали траекторию длиной 5 нс с зафиксированной молекулой белка, а затем 50 нс без каких-либо ограничений. Стабильность димера анализировали по изменению углов скрещивания осей α -спиралей и наклона относительно плоскости бислоя, изменению вторичной структуры, а также по значению среднеквадратичного отклонения (СКО) координат атомов основной цепи в структуре белка от начальных значений.

Расчет свободной энергии димеризации α -спиралей

Профили свободной энергии ассоциации ТМ-доменов рецептора получали методом интегрирования средней силы, действующей между мономерами. В качестве координаты реакции использовали расстояние между центрами масс пептидов. Для этого создавали набор состояний димера, характеризующихся различным расстоянием между мономерами (32 точки, от 0.75 до 2.10 нм с шагом 0.05 нм). Начальные состояния получали путем параллельного переноса мономеров на заданное расстояние вдоль прямой, проходящей через их центры масс. Релаксацию мембраны

в МД производили в течение 50 нс, длина расчетной траектории также составляла 50 нс. Для каждого из состояний рассчитывали значение средней силы, действующей между мономерами белка, и интегрировали. В полученных энергетических профилях оценивали ошибку путем независимого расчета для пяти неперекрывающихся фрагментов каждой траектории МД. Для каждой системы провели по два независимых расчета, суммарная длина используемых траекторий МД составила около 10 мкс.

Разложение энергии взаимодействия α -спиралей на компоненты

Для разложения суммарного энергетического профиля на составляющие использовали следующий подход: по координатам атомов на каждом шаге МД заново рассчитывали силы, учитывая лишь вклады тех подсистем, влияние которых хотели установить. Далее эти силы усредняли по длине траектории МД, проецировали на направление, соответствующее координате реакции, и интегрировали. При построении диаграмм распределения вкладов отдельных аминокислотных остатков выбирали значения энергии, соответствующие глобальному минимуму в суммарном профиле потенциала средней силы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность пептидов в липидном бислое

Показано, что в ходе МД все модели ТМ-доменов GrA стабильны по набору исследуемых параметров. Так, не наблюдали расплетания α -спиралей в центральной части, углы скрещивания осей α -спиралей в димерах были близки к начальным значениям (табл. 2). В случае мономеров наблюдали наклон спирали относительно нормали мембраны, обусловленный подстройкой пептида под окружение – так называемый эффект гидрофобного соответствия. Во всех системах происходило частичное расплетание концов спиралей в области контакта с водой. В димере GrA дикого типа, а также в мутанте Gly83Ala наблюдали образование остатками Thr87 межмолекулярной водородной связи, которая рассматривается как один из важных факторов, стабилизирующих димер. Тем не менее димер с мутацией Thr87Val, делающей такую связь невозможной, стабильно существовал в МД и не отличался значительно по другим параметрам.

Свободная энергия димеризации α -спиралей GrA

Полученные профили энергии ассоциации всех трех изучаемых систем свидетельствуют о наличии стабильного димерного состояния у каждого из белков, однако глубина минимума энергии различается

Таблица 2. Стабильность димеров GrA в расчетах МД. Среднеквадратичное отклонение (СКО) структуры от стартовой, изменение вторичной структуры и угла скрещивания

Структура	Среднеквадратичное отклонение от начальной структуры, нм*	Угол скрещивания осей α -спиралей, град	Содержание α -спиральной конформации, %
Стартовая	0.0	-40 ± 2	84 ± 2
GrA	2.9 ± 0.2 (1.5 ± 0.1)	-39 ± 3	74 ± 2
GrA Thr87Val	2.4 ± 0.3 (1.7 ± 0.3)	-57 ± 4	73 ± 2
GrA Gly83Ala	1.9 ± 0.4 (1.3 ± 0.5)	-47 ± 7	77 ± 2

*СКО рассчитывали по координатам атомов основной цепи пептидов, в скобках дано значение для остатков Ile73-Ile95.

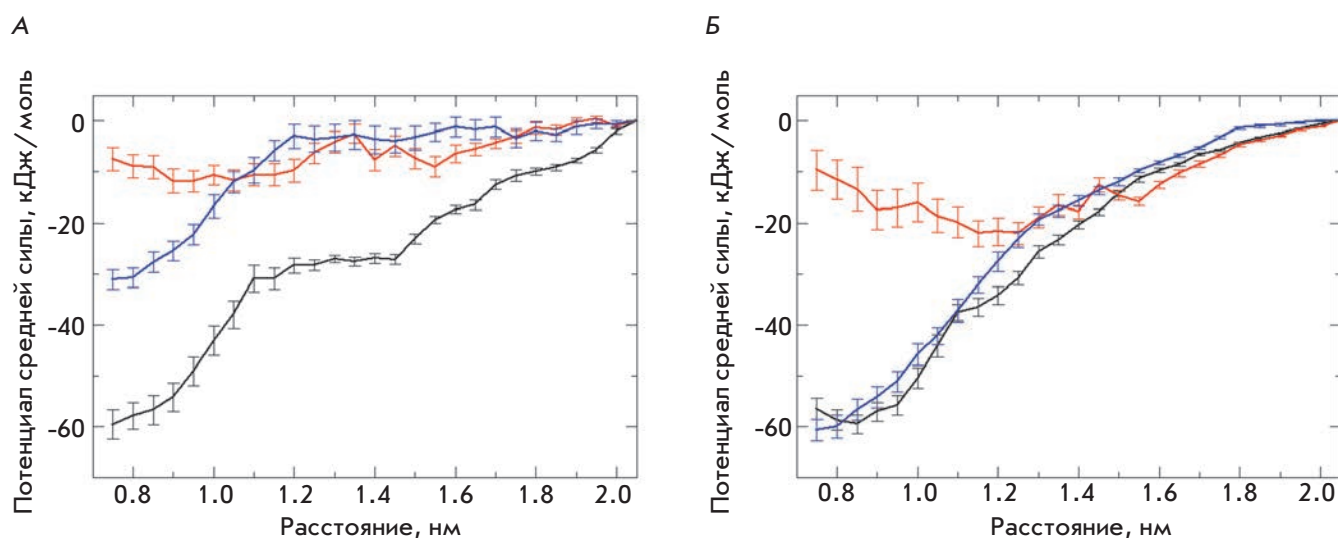


Рис. 1. Профили свободной энергии димеризации ТМ-доменов GrA дикого типа (черный), мутантных форм Thr87Val (красный) и Gly83Ala (синий) в бислое ПОФХ. А – суммарные профили свободной энергии; Б – вклад белок-белковых взаимодействий в центральной части α -спиралей (остатки Ile73–Ile95)

(рис. 1А). Так, мутант Thr87Val обладает очень небольшой (по модулю) свободной энергией димеризации (-16 ± 3 кДж/моль) по сравнению с димером дикого типа (-60 ± 3 кДж/моль). Мутация Gly83Ala также ослабляет димеризацию, но не так сильно (-30 ± 5 кДж/моль). Таким образом, поведение исследуемых пептидов различается. Для более детального исследования различий построили аналогичные энергетические профили непосредственного взаимодействия белок-белок без учета вкладов липидов и воды (рис. 1Б). Оказалось, что мутант Gly83Ala практически не отличается по энергии от димера дикого типа, имеет энергетический профиль той же формы и глубины, в то время как мутант Thr87Val и в данном случае является значительно более слабым. Таким образом, мутация Gly83Ala затрагивает взаимодействие ТМ-домена GrA с липидным окружением, а не прямой контакт мономеров. При срав-

нении кривых можно также заметить, что в случае суммарных профилей энергии минимумы смещены в сторону меньших расстояний по сравнению с профилями, характеризующими белок-белковые взаимодействия. Таким образом, мембрана «приводит» мономеры в более плотный контакт по сравнению с их равновесным положением без учета эффектов среды.

Вклады аминокислотных остатков

При детальном изучении распределения энергетических вкладов по остаткам было показано, что остатки, лежащие на интерфейсе димеризации, могут формировать энергетически невыгодные контакты (Gly79, Val80, Gly83, Thr87), в то время как основной вклад, способствующий образованию комплекса, вносят остатки, взаимодействующие с мембраной (Phe78, Ala82, Ile89, Tyr93) (рис. 2А). Влияние мута-

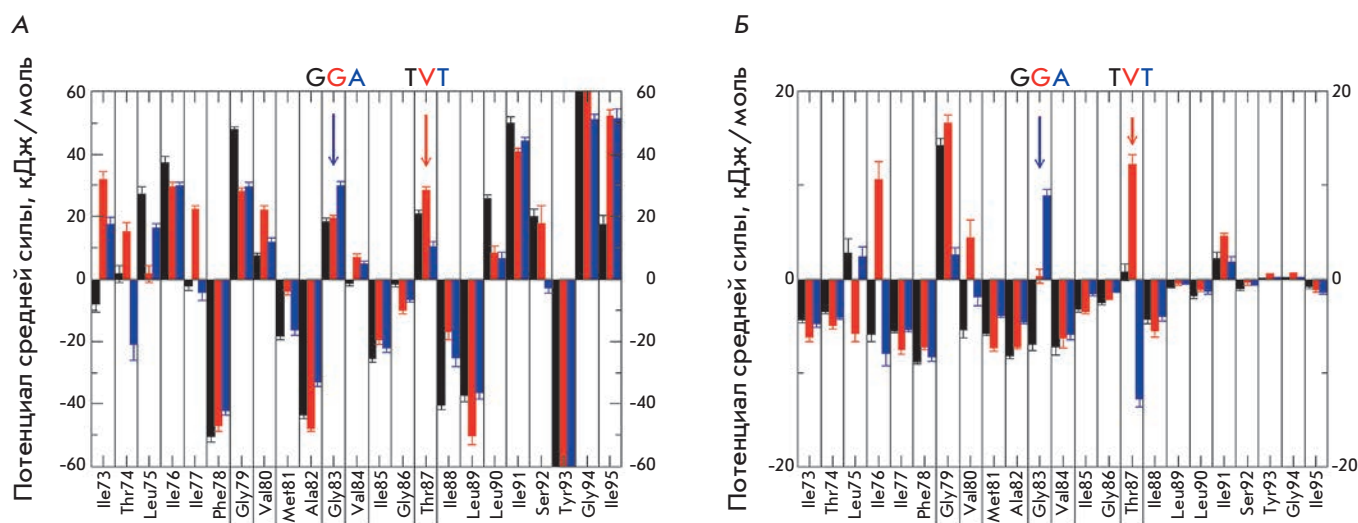


Рис. 2. Диаграммы вкладов аминокислотных остатков в свободную энергию ассоциации ТМ доменов GrA дикого типа (черный) и его мутантных форм Thr87Val (красный) и Gly83Ala (синий). А — вклады в суммарную свободную энергию димеризации; Б — вклады в белок-белковые взаимодействия. Цветными стрелками указано положение соответствующих мутаций. Рамками обведены остатки, участвующие в непосредственном контакте мономеров между собой

ции Thr87Val ярко проявляется в белок-белковых взаимодействиях, в то время как мутация Gly83Ala в этом случае вызывает компенсационный эффект (рис. 2Б). Таким образом, влияние этих двух мутаций имеет различную природу: замена Thr87Val нарушает белок-белковые взаимодействия, делая невозможной водородную связь, в то время как Gly83Ala приводит к незначительной перестройке структуры, дестабилизируя взаимодействие димера с мембранным окружением. Здесь также следует отметить, что остаток Gly83 в димере с липидами не взаимодействует и опосредованно влияет на всю структуру, улучшает общую упаковку в белок-белковых контактах (табл. 2, рис. 1Б), но ухудшает взаимодействие с мембранным окружением. Таким образом, при описании взаимодействия α -спиралей в мембране недостаточно рассмотрения белок-белковых взаимодействий и плотности упаковки белковой структуры. Липидное окружение может вносить не меньший вклад в стабилизацию димерных форм, поэтому важно также изучение эффектов, оказываемых ТМ-пептидами той или иной природы на мембрану.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты атомистического моделирования взаимодействия ТМ-доменов гликофорина А и двух его мутантных форм показывают, что липидная мембрана играет важную роль в образовании димера наряду

с непосредственным контактом между мономерами. Один из основных выводов настоящей работы состоит в том, что взаимодействия между лежащими на интерфейсе спираль-спираль остатками ТМ-сегментов белков часто являются энергетически невыгодными. Это, однако, компенсируется выгодными вкладами в суммарную свободную энергию системы контактов белок-среда. Предложены два различных сценария нарушения ассоциации ТМ-спиралей GrA, вызванного точечными мутациями. Так, мутация Thr87Val напрямую нарушает белок-белковые взаимодействия, а замена Gly83Ala вызывает опосредованный эффект, влияя на мембранное окружение рецептора. Таким образом, водно-липидная среда активно участвует в функционировании рецепторных систем клетки, и ее роль необходимо учитывать при рассмотрении работы мембранных белков, а также при рациональном конструировании новых молекул, способных заданным образом модулировать работу сигнальных и других мембранных систем, в первую очередь, рецепторных тирозинкиназ. ●

Расчеты выполняли с использованием вычислительных ресурсов Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00871).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moreau A., Gosselin-Badaroudine P., Chahine M. // *Q. Rev. Biophys.* 2014. V. 47. № 4. P. 364–388.
2. Raja M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. V. 510. № 1. P. 1–10.
3. Williamson I.M., Alvis S.J., East J.M., Lee A.G. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 8. P. 1581–1590.
4. Prasanna X., Chattopadhyay A., Sengupta A. // *Biophys. J.* 2014. V. 106. № 6. P. 1290–1300.
5. Bocharov E.V., Mineev K.S., Goncharuk M.V., Arseniev A.S. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2012. V. 1818. № 9. P. 2158–2170.
6. Bocharov E.V., Lesovoy D.M., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Hristova K., Arseniev A.S. // *Structure.* 2013. V. 21. № 11. P. 2087–2093.
7. Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. // *Cell.* 2009. V. 137. № 7. P. 1293–1307.
8. Endres N.F., Das R., Smith A.W., Arkhipov A., Kovacs E., Huang Y., Pelton J.G., Shan Y., Shaw D.E., Wemmer D.E., et al. // *Cell.* 2013. V. 152. № 3. P. 543–556.
9. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. № 5. P. 881–889.
10. Fleming K.G., Engelman D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 25. P. 14340–14344.
11. Efremov R.G., Vereshaga Y.A., Volynsky P.E., Nolde D.E., Arseniev A.S. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. V. 20. № 1. P. 27–45.
12. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 35. P. 14390–14400.
13. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 22. P. 8105–8108.
14. Roskoski R. // *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 2014. V. 79. P. 34–74.
15. Li E., Hristova K. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 20. P. 6241–6251.
16. Hubert P., Sawma P., Duneau J.-P., Khao J., Hénin J., Bagnard D., Sturgis J. // *Cell Adhes. Migr.* 2010. V. 4. № 2. P. 313–324.
17. Najumudeen A.K., Kajanajmudeen A. // *Sci. Signal.* 2010. V. 3. № 138. P. jc6.
18. Bennisroune A., Fickova M., Gardin A., Dirrig-Grosch S., Aunis D., Crémel G., Hubert P. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 7. P. 3464–3474.
19. Arpel A., Sawma P., Spenlé C., Fritz J., Meyer L., Garnier N., Velázquez-Quesada I., Hussenet T., Aci-Sèche S., Baumlin N., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. № 6. P. 1714–1721.
20. Yin H., Slusky J.S., Berger B.W., Walters R.S., Vilaire G., Litvinov R.I., Lear J.D., Caputo G.A., Bennett J.S., DeGrado W.F. // *Science.* 2007. V. 315. № 5820. P. 1817–1822.
21. Yano Y., Kondo K., Kitani R., Yamamoto A., Matsuzaki K. // *Biochemistry.* 2015. V. 54. № 6. P. 1371–1379.
22. Russ W.P., Engelman D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 3. P. 863–868.
23. Bocharov E.V., Volynsky P.E., Pavlov K.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Cell Adhes. Migr.* 2010. V. 4. № 2. P. 284–298.
24. Mineev K.S., Lesovoy D.M., Usmanova D.R., Goncharuk S.A., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2014. V. 1838. № 1. P. 164–172.
25. Smith S.O., Bormann B.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 2. P. 488–491.
26. Pohorille A., Jarzynski C., Chipot C. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. № 32. P. 10235–10253.
27. Hénin J., Pohorille A., Chipot C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 23. P. 8478–8484.
28. Engelman D.M., Adair B.D., Brünger A., Flanagan J.M., Hunt J.F., Lemmon M.A., Treutlein H., Zhang J. // *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 1993. V. 48. P. 11–21.
29. Melnyk R.A., Kim S., Curran A.R., Engelman D.M., Bowie J.U., Deber C.M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 16. P. 16591–16597.
30. Doura A.K., Kobus F.J., Dubrovsky L., Hibbard E., Fleming K.G.J. // *Mol. Biol.* 2004. V. 341. № 4. P. 991–998.
31. Prakash A., Janosi L., Doxastakis M. // *Biophys. J.* 2011. V. 101. № 8. P. 1949–1958.
32. Cuthbertson J.M., Bond P.J., Sansom M.S.P. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 48. P. 14298–14310.
33. Duong M.T., Jaszewski T.M., Fleming K.G., MacKenzie K.R. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371. № 2. P. 422–434.
34. Mueller B.K., Subramaniam S., Senes A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 10. P. E888–E895.
35. Janosi L., Prakash A., Doxastakis M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 1. P. 284–292.
36. Johnson R.M., Rath A., Melnyk R.A., Deber C.M. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 28. P. 8507–8515.
37. Mehrbod M., Mofrad M.R.K. // *PLoSComput. Biol.* 2013. V. 9. № 3. P. e1002948.
38. Caputo G.A. // *Meth. Mol. Biol.* 2013. V. 1063. P. 95–116.
39. Pyrkova D.V., Tarasova N.K., Pyrkov T.V., Krylov N.A., Efremov R.G. // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 6. P. 2569–2579.
40. Parton D.L., Tek A., Baaden M., Sansom M.S.P. // *PLoSComput. Biol.* 2013. V. 9. № 4. P. e1003034.
41. Lensink M.F., Govaerts C., Ruysschaert J.-M. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 14. P. 10519–10526.
42. Poveda J.A., Giudici A.M., Renart M.L., Molina M.L., Montoya E., Fernández-Carvajal A., Fernández-Ballester G., Encinar J.A., González-Ros J.M. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2014. V. 1838. № 6. P. 1560–1567.
43. Dave P.C., Tiburu E.K., Damodaran K., Lorigan G.A. // *Biophys. J.* 2004. V. 86. № 3. P. 1564–1573.
44. Stangl M., Schneider D. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2015. V. 1848. № 9. P. 1886–1896.
45. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. № 9. P. 4415–4426.
46. Lemmon M.A., Flanagan J.M., Treutlein H.R., Zhang J., Engelman D.M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 51. P. 12719–12725.
47. Lee J., Im W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 20. P. 6456–6462.
48. Минеев К.С., Бочаров Э.В., Вольнский П.Е., Гончарук М.В., Ткач Е.Н., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Чупин В.В., Масленников И.В., Ефремов Р.Г. и др. // *Acta Naturae.* 2001. Т. 3. № 2. С. 94–102.
49. van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1701–1718.
50. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684.
51. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. № 1. P. 014101.

УДК 577.152.41

Сульфоксиды – аналоги L-метионина и L-цистеина как пролекарства против грамположительных и грамотрицательных бактерий

Н. В. Ануфриева¹, Е. А. Морозова¹, В. В. Куликова¹, Н. П. Бажулина¹, И. В. Манухов², Д. И. Дёгтев², Е. Ю. Гнучих², А. Н. Родионов¹, Г. Б. Завильгельский², Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1

*E-mail: tvd@eimb.ru, tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.08.2015

РЕФЕРАТ Проблема резистентности бактерий к антибиотикам требует разработки новых классов антимикробных препаратов широкого спектра действия. Концепция пролекарств позволяет искать новые подходы к получению эффективных препаратов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Известно, что антимикробной активностью обладают тиосульфиды, образующиеся ферментативно из сульфоксидов аминокислот при разрушении клеток растений рода *Allium*. Неустойчивость и высокая реакционная способность тиосульфидов затрудняют их использование как индивидуальных соединений. Предложена фармакологически комплементарная пара: пролекарство – сульфоксид аминокислоты и витамин B6-зависимая метионин- γ -лиаза (МГЛ), метаболизирующая его в организме пациента. Фермент катализирует реакции γ - и β -элиминирования сульфоксидов – аналогов L-метионина и L-цистеина с образованием тиосульфидов. Нами клонирован ген МГЛ из *Clostridium sporogenes*. Методом логнормального разложения спектра холофермента установлены ионные и таутомерные формы внутреннего альдимида МГЛ, получены каталитические параметры рекомбинантного фермента в реакциях γ - и β -элиминирования аминокислот и ряда сульфоксидов. Установлена возможность использования витамин B6-зависимой МГЛ для эффективной конверсии сульфоксидов, выявлена антимикробная активность тиосульфидов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий *in situ*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пролекарства, витамин B6-зависимые ферменты, клонирование гена метионин- γ -лиазы из *Clostridium sporogenes*, аллиин, аллицин, сульфоксиды аминокислот, грамположительные и грамотрицательные бактерии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; МГЛ – метионин- γ -лиаза; His-tag – полигистидиновый фрагмент; His-tag МГЛ – метионин- γ -лиаза с полигистидиновым фрагментом; *megL* – ген, кодирующий МГЛ *Clostridium sporogenes*; ДТТ – дитиотреитол; NADH – β -никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

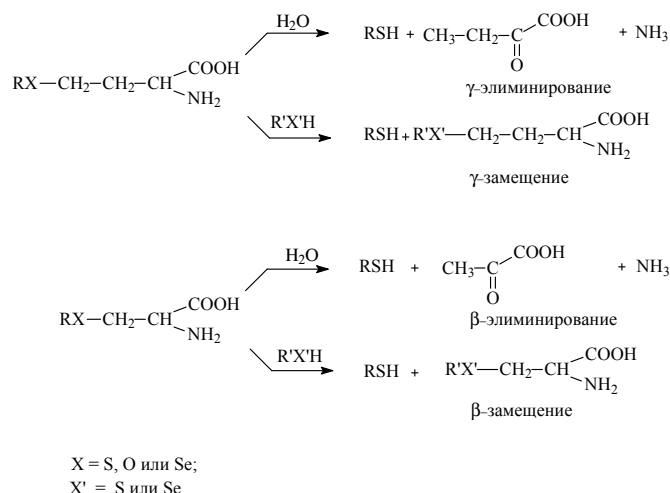
ВВЕДЕНИЕ

Проблема поиска новых антимикробных препаратов с минимальным риском индукции быстрой устойчивости к антибиотикам весьма остро стоит в настоящее время. Многие потенциально эффективные антимикробные средства достаточно быстро деградируют в организме человека и обладают повышенной токсичностью, что затрудняет их применение в концентрации, нужной для терапии. Эту проблему можно решить с помощью концепции пролекарств – препаратов, которые должны подвергнуться метабо-

лизму в организме пациента. Эту концепцию успешно применили в противоопухолевой терапии [1].

В представленной работе предложено использовать этот подход для создания эффективной антимикробной терапии с помощью фармакологической пары: пролекарство и биокатализатор, его метаболизирующий. Недавно мы показали, что метионин- γ -лиаза (МГЛ) [КФ 4.4.1.11] из *Citrobacter freundii* катализирует реакцию β -элиминирования небелковой аминокислоты, (\pm)-сульфоксида S-(2-пропенил)-L-цистеина ((\pm)-аллиина), с образованием 2-пропени-

осульфината (аллицина) – природного антибиотика [2]. МГЛ катализирует реакцию γ -элиминирования *L*-метионина с образованием метилмеркаптана, α -кетомасляной кислоты и аммиака. Фермент катализирует реакцию β -элиминирования *L*-цистеина и его *S*-замещенных производных с образованием соответствующих меркаптанов, пировиноградной кислоты и аммиака и реакции замещения у C_{β} - и C_{γ} -атомов *L*-цистеина и *L*-метионина и их аналогов [3, 4]:



МГЛ содержится в грибах [5], *Arabidopsis thaliana* [6], в различных видах бактерий, в том числе в патогенных *Aeromonas* spp. [7], *Clostridium sporogenes* [8], *Porphyromonas gingivalis* [9] и в патогенных простейших *Entamoeba histolytica* [10] и *Trichomonas vaginalis* [11]. Фермент отсутствует у млекопитающих, поэтому может рассматриваться как мишень в патогенах. Такой подход применили с использованием суцидального субстрата фермента. Катализ реакции γ -элиминирования трифторметионина приводил к образованию трифтормеркаптана, спонтанно разлагающегося до дифторида тиоугольной кислоты, который обладает антимикробной активностью в отношении содержащих МГЛ *T. vaginalis* [12], *P. gingivalis* [13], *E. histolytica* [14]. Однако высокая токсичность дифторида тиоугольной кислоты не позволяет использовать трифторметионин как антимикробное средство.

Аллицин, наиболее известный антимикробный и противоопухолевый компонент чеснока, составляет около 70% от общего количества тиосульфидов [15], образующихся в результате реакции β -элиминирования аллиина, катализируемой ПЛФ-зависимой аллииназой [КФ 4.4.1.4] [16] при разрушении чеснока. Антимикробное действие аллицина и других тиосульфидов, образующихся ферментативно при разрушении клеток растений рода *Allium*, во многом объясняется тем, что они окисляют суль-

фгидрильные группы белков/ферментов бактериальных клеток, в то время как клетки животных частично защищены присутствующим в них глутатионом [17]. Противомикробные, противовоспалительные, антиоксидантные и антиканцерогенные эффекты органических сульфосоединений, экстрактов клеток чеснока и лука [18, 19] известны с древнейших времен. Однако отдельные тиосульфиды не используются в медицине из-за их высокой реакционной способности и, как следствие, неустойчивости. Как индивидуальное биологически активное соединение, наиболее подробно изучен только аллицин, обнаружены его противоопухолевые, антиоксидантные, антибактериальные и противогрибковые свойства [20–22].

Способность МГЛ катализировать реакции γ - и β -элиминирования сульфоксида метионина [23] и аллиина [2] с образованием тиосульфидов позволяет применить концепцию пролекарств для разработки нового антимикробного препарата, используя в качестве пролекарств аллиин и другие субстраты-сульфоксиды как источники тиосульфидов *in situ*.

Ранее мы клонировали ген (*megL*) *C. sporogenes*, кодирующий МГЛ с полигистидиновым фрагментом (His-tag) на N-конце полипептидной цепи, определили некоторые кинетические характеристики рекомбинантного фермента (His-tag МГЛ). МГЛ *C. sporogenes* катализировала реакцию γ -элиминирования *L*-метионина с большей скоростью, чем фермент из *C. freundii* [24], и обладала лучшей цитостатической активностью в отношении ряда опухолевых клеток [25].

Скорость расщепления физиологического субстрата *C. sporogenes* МГЛ возрастала в 1.5 раза после отщепления His-tag тромбином. В данной работе мы клонировали ген МГЛ *C. sporogenes* без His-tag. Определены стационарные кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования ряда известных субстратов и сульфоксидов – аналогов цистеина и метионина и спектральные характеристики *C. sporogenes* МГЛ. На твердой среде показана антибактериальная активность смесей, содержащих МГЛ из *C. sporogenes* и *C. freundii* и сульфоксиды аминокислот. Установлено, что кинетические параметры рекомбинантной ПЛФ-зависимой МГЛ делают принципиально возможным использование фермента в конверсии пролекарств – сульфоксидов аминокислот – в тиосульфиды.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы, ферменты

В работе использовали: пиридоксаль-5'-фосфат, *L*-метионин, *L*-цистеин, *L*-гомоцистеин, *L*-норвалин,

L-норлейцин, *L*- α -аминомасляную кислоту, аллиин, *S*-этил-*L*-цистеин, *S*-этил-*L*-гомоцистеин, *L*-аланин, *O*-ацетил-*L*-серин, лактатдегидрогеназу из мышцы кролика, ДТТ, NADH, периодат натрия, этилбромид (Sigma, США); EDTA, протамин-сульфат (Serva, США); лактозу (Panreac, Испания); глюкозу, глицерин, сульфат магния, сульфат аммония, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный («Реахим», Россия); дрожжевой экстракт, триптон (Difco, США); DEAE-сефарозу (GE Healthcare, Швеция); *O*-ацетил-*L*-гомосерин получен ацетилизированием *L*-гомосерина по описанному ранее методу [26]. 2-Нитро-5-тиобензойная кислота получена согласно [27]. (\pm)-Сульфоксид *L*-метионина получали по стандартной методике [28]. Синтез (\pm)-сульфоксидов *S*-этил-*L*-цистеина и *S*-этил-*L*-гомоцистеина проводили согласно [29–31].

Реакции рестрикции и лигирования проводили с использованием ферментов фирмы Promega (США). В работе использовали «рабочий буфер», рН 8.0, содержащий 100 мМ калий-фосфат, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ и 1 мМ EDTA.

Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) F⁻ *ompT hsdS_B gal dcm* (DE3) (Novagen) был использован для экспрессии гена *C. sporogenes* МГЛ. Штамм *E. coli* K12 AB2463 – *recA*⁻ производное штамма *E. coli* K12, имеет генотип: F⁻, *thr-1 leu-6 proA2 his-4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44, recA13*. Его использовали для клонирования, наработки и хранения плазмиды. Штамм *C. freundii* ATCC 21434 из American Type Culture Collection (США) любезно предоставлен Р.С. Филлипсом. Штамм 015 *Staphylococcus aureus* любезно предоставлен Ю.Ф. Белым. Плаزمида с геном *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназы любезно предоставлена К. Мураторе.

Клонирование гена МГЛ из *C. sporogenes*

Плазмида рЕТ28а-*megL_sporog* сконструирована на основе плазмиды рЕТ28а, содержащей ген *megL* *C. sporogenes* с полигистидиновым фрагментом (His-tag) и обозначена как рЕТ-28а::*megL_s_HT* [24]. Методом ПЦР получен ампликон (*megL_sporog*), содержащий ген *megL* без His-tag. В качестве матрицы использовали плазмиду рЕТ28а, содержащую ген *megL* с His-tag. В праймерах был предусмотрен сайт рестрикции NcoI (подчеркнут): *megL_sporog*: 5'-CGC-GCGGCAGCCCATGGAGAA-3' (прямой), *megL_sporog*: 5'-CCGGATCTCAGTGGTGGTGGTG-3' (обратный).

Ампликон *megL_sporog* клонировали в векторе рЕТ28а по сайтам NcoI и EcoRI в *recA*⁻ штамме *E. coli* AB2463. Контроль клонирования осуществляли пу-

тем секвенирования вставки. Трансформацию проводили, используя штамм *E. coli* BL21(DE3).

Выращивание биомассы и выделение фермента

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие ген МГЛ без His-tag в плазмиде рЕТ28а *megL_sporog*, выращивали на «индуцирующей» среде [32] при 37°C с перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием и хранили при -80°C. Клетки разрушали и освобождали от нуклеиновых кислот как описано ранее [33]. Далее очистку проводили с использованием ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой, уравновешенной рабочим буфером. Колонку промывали рабочим буфером, содержащим 100 мМ KCl. Фермент элюировали рабочим буфером, содержащим 500 мМ KCl, концентрировали и диализовали против рабочего буфера. Чистоту препарата проверяли при помощи ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [34]. Концентрацию очищенных препаратов определяли, используя коэффициент $A_{1\%}^{278} = 0.8$ [23].

Определение активности фермента и параметров стационарной кинетики

Активность МГЛ в процессе очистки определяли в реакциях γ - и β -элиминирования, измеряя скорости образования кетокислот в сопряженной реакции с *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой (реакция γ -элиминирования) или лактатдегидрогеназой (реакция β -элиминирования) по снижению поглощения NADH при 340 нм ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 30°C. Реакционные смеси содержали рабочий буфер, 0.2 мМ NADH, 10 ед. лактатдегидрогеназы или 70 мкг *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназы, 30 мМ *S*-этил-*L*-цистеина или 30 мМ *L*-метионина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1.0 мкМ/мин пирувата (или α -кетобутирата). Удельная активность препаратов фермента, имеющих 95% чистоты, составила 26.8 ед./мг в реакции γ -элиминирования *L*-метионина и 8.32 ед./мг в реакции β -элиминирования *S*-этил-*L*-цистеина.

Стационарные кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования определяли таким же образом, варьируя концентрации субстратов. Полученные данные обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен с использованием программы EnzFitter. В расчетах использовали величину молекулярной массы субъединицы фермента, равную 43 кДа. Ингибирование реакции γ -элиминирования *L*-метионина различными аминокислотами изучали в условиях, описанных выше, варьируя концентрацию субстратов и ингибиторов в реакционных смесях.

Значения констант ингибирования определяли с помощью программы EnzFitter. Данные обрабатывали в координатах Диксона [35].

Спектральные исследования

Спектр поглощения холофермента регистрировали при 25°C на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) в рабочем буфере без ПЛФ. Концентрация фермента – 1.036 мг/мл.

Антимикробная активность препаратов

Ночные культуры *C. freundii* и *S. aureus*, выращенные на среде Лурия–Бертани (LB-среда) при 37°C, разводили в 100 раз в среде LB и растили при 37°C при перемешивании до оптической плотности 0.2–0.3 при 600 нм. Культуры бактерий рассевали на чашки с твердой средой (LB-агар). Смеси МГЛ из разных источников и сульфоксидов аминокислот, предварительно инкубированные при комнатной температуре в течение 1 ч, наносили на диски из фильтровальной бумаги диаметром 12 мм, помещенные на чашки. Концентрации МГЛ из *C. sporogenes* и *C. freundii* и сульфоксидов составляли 10 и 2.5 мг/мл соответственно. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 37°C, затем измеряли зоны ингибирования. Контрольные препараты растворов смесей фермента с сульфоксидами сохраняли антибактериальную активность в течение 2 недель.

Определение аллицина

Аллицин, образующийся в смесях, содержащих МГЛ и аллиин, определяли в реакции с 2-нитро-5-тиобензойной кислотой. Смесь МГЛ и аллиина добавляли к 1 мл 0.1 мМ 2-нитро-5-тиобензойной кислоты в 100 мМ калий-фосфатном буфере, содержащем 0.2 мМ ПЛФ, рН 8.0. Смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Молярную концентрацию аллицина рассчитывали по уменьшению оптической плотности при 412 нм, используя значение молярного коэффициента поглощения 2-нитро-5-тиобензойной кислоты при 412 нм, равное 28300 М⁻¹см⁻¹ [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакций

β- и γ-элиминирования

Ранее [25] мы определили, что отщепление тромбином His-tag от МГЛ *C. sporogenes* приводит к повышению в 1.5 раза активности фермента в физиологической реакции с L-метионином. В данной работе определены параметры стационарной кинетики МГЛ *C. sporogenes* без His-tag в реакции γ-элиминирования пяти субстратов – L-метионина, сульфоксида L-метионина, S-этил-L-гомоцистеина,

сульфоксида S-этил-L-гомоцистеина и O-ацетил-L-гомосерина, в реакции β-элиминирования четырех субстратов – S-этил-L-цистеина, сульфоксида S-этил-L-цистеина, O-ацетил-L-серина и аллиина. В табл. 1 приведены параметры для МГЛ из *C. sporogenes*, для МГЛ из двух других бактериальных источников и His-tag МГЛ *C. sporogenes*.

У МГЛ *C. sporogenes* параметр $k_{кат}$ в реакции γ-элиминирования трех субстратов – L-метионина, S-этил-L-гомоцистеина и сульфоксида L-метионина, оказался в 2–3 раза больше, чем у His-tag МГЛ *C. sporogenes*. Величины K_m для первых двух субстратов оказались близкими, в случае сульфоксида L-метионина величина K_m была несколько больше, чем у His-tag МГЛ.

Фрагмент His-tag не влияет на кинетические параметры реакции β-элиминирования S-этил-L-цистеина, величины $k_{кат}$ и K_m у МГЛ практически такие же, как у His-tag МГЛ. Катализ стадии элиминирования боковой группы субстрата в реакциях γ- и β-элиминирования осуществляется разными кислотными группами фермента. Предполагается, что в реакции β-элиминирования, катализируемой ПЛФ-зависимыми лиазами, такой группой является боковая группа остатка лизина (Lys210 в *C. freundii* МГЛ), связывающего кофермент [36]. В ПЛФ-зависимых реакциях γ-элиминирования и γ-замещения эта роль приписывается консервативному остатку тирозина (Tyr113 в *C. freundii* МГЛ), находящемуся в стекинг-взаимодействии с кольцом кофермента [36]. Это предположение подтверждают данные для мутантной формы МГЛ *Pseudomonas putida* с заменой Tyr114 на Phe [37]. Получены также свидетельства того, что кислотно-основные свойства Tyr113 МГЛ *C. freundii* регулируются триадой Cys115/Tyr113/Arg60 [2]. Arg60 расположен в подвижной N-концевой петле фермента, и атом азота гуанидиновой группы находится на расстоянии водородной связи от гидроксильной группы Tyr113 в трехмерной структуре холофермента [38], в структурах комплексов МГЛ с аминокислотами, моделирующими комплекс Михаэлиса [39], и в пространственной структуре внешнего альдимина фермента с глицином [40]. Фрагмент His-tag может влиять на конформацию N-концевой петли и, следовательно, на взаимное расположение гидроксильной группы Tyr113 и гуанидиновой группы Arg60, что, в свою очередь, может влиять на величину pK_a гидроксильной группы Tyr113. Возможно, этим объясняется увеличение γ-элиминирующей активности МГЛ *C. sporogenes* по сравнению с His-tag МГЛ.

Сравнение ферментов из трех бактериальных источников (табл. 1) – *P. putida*, *C. freundii* и *C. spo-*

Таблица 1. Кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования*

Субстрат	МГЛ <i>C. sporogenes</i>			His-tag МГЛ <i>C. sporogenes</i> **			МГЛ <i>C. freundii</i> ***			МГЛ <i>P. putida</i> ****		
	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹
L-Met	21.61	0.60	3.60×10^4	9.86	0.43	2.28×10^4	6.2	0.7	8.85×10^3	48.6	0.90	5.4×10^4
(±)-L-MetO	21.66	11.39	1.90×10^3	8.59	7.89	1.09×10^3	8.12	4.65	1.75×10^3	-	-	-
S-Et-L-Hcy	21.31	0.24	8.87×10^4	7.05	0.27	2.54×10^4	6.78	0.54	1.25×10^4	33.4	0.27	1.23×10^5
(±)-S-Et-L-HcyO	0.48	0.60	8.0×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-Ac-L-Hse	37.26	3.18	1.17×10^4	-	-	-	2.1	2.91	7.21×10^2	78.0	2.22	3.51×10^4
S-Et-L-Cys	6.53	0.43	1.52×10^4	6.3	0.358	1.76×10^4	5.03	0.17	2.96×10^4	5.79	0.48	1.21×10^4
(±)-S-Et-L-CysO	1.39	0.33	4.21×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-Ac-L-Ser	5.31	8.01	6.6×10^2	-	-	-	2.13	4.28	4.98×10^2	-	-	-
(±)-Аллиин	11.43	1.43	7.99×10^3	-	-	-	5.9	4.7	1.26×10^3	-	-	-

*Ошибка не превышала 10%.

**Данные [25].

***Данные [2, 23, 33].

****Данные [37].

rogenes, показало, что сродство как к физиологическому субстрату, так и к его аналогам практически одинаково. Каталитические эффективности реакции γ -элиминирования L-метионина у МГЛ *C. sporogenes* и *P. putida* близки, а величина $k_{\text{кат}}/K_M$ у МГЛ *C. freundii* несколько меньше. Кинетические параметры реакции β -элиминирования S-этил-L-цистеина у трех ферментов очень близки.

МГЛ *C. sporogenes* катализирует реакцию γ -элиминирования сульфоксида L-метионина с каталитической эффективностью на порядок большей, чем в реакции γ -элиминирования сульфоксида S-этил-L-гомоцистеина. Скорость реакции β -элиминирования сульфоксида S-этил-L-цистеина, катализируемой ферментом, в 15 раз меньше скорости реакции γ -элиминирования сульфоксида L-метионина, но за счет большего сродства МГЛ *C. sporogenes* к этому субстрату каталитическая эффективность практически одинакова. В реакциях с сульфоксидами аминокислот наиболее эффективно фермент катализирует реакцию β -элиминирования аллиина.

Фермент из *C. sporogenes* более эффективно катализирует реакцию γ -элиминирования сульфоксида L-метионина, чем МГЛ *C. freundii* (величины $k_{\text{кат}}$ больше в 2.5 раза). Скорость расщепления аллиина МГЛ *C. sporogenes* почти в 2 раза больше, чем у фермента *C. freundii*, сродство к субстрату в 3 раза, а эффективность катализа в 6.3 раза выше.

Аминокислоты с неразветвленной боковой цепью ингибировали реакцию γ -элиминирования L-метионина по конкурентному типу. В табл. 2 приведены константы ингибирования МГЛ из *C. sporogenes*, *C. freundii* и *P. putida*. У всех этих ферментов наблюдается улучшение связывания с увеличением количества метиленовых групп в аминокислотах с неразветвленной боковой цепью, что, вероятно, объясняется гидрофобным характером активных центров фермента из *P. putida* [41] и *C. freundii* [38]. Возможно, значительное возрастание сродства при переходе от L-норвалина к L-норлейцину у фермента из трех источников и близкие значения величин K_i L-норлейцина и K_M для L-метионина

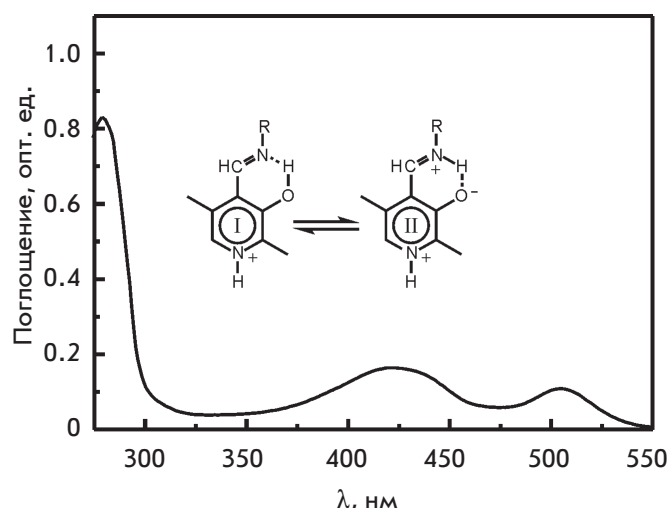


Рис. 1. Спектр поглощения холофермента МГЛ *C. sporogenes*

Таблица 2. Ингибирование реакции γ -элиминирования *L*-метионина*

Аминокислота	K_i , мМ		
	<i>C. freundii</i> **	<i>C. sporogenes</i>	<i>P. putida</i> ***
<i>L</i> -Ala	3.4	1.5	5.1
<i>L</i> -Abu	8.3	2.0	8.4
<i>L</i> -Nva	4.7	1.9	3.0
<i>L</i> -Nle	0.6	0.37	0.5

*Ошибка не превышала 10%.

**Данные [23].

***Данные [43].

Таблица 3. Параметры полос спектра поглощения внутреннего альдимины *C. sporogenes* МГЛ

Структура	E , эВ	$\nu \times 10^{-3}$, cm^{-1}	λ , нм	$\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$W \times 10^{-3}$, cm^{-1}	ρ	f	n , %
II ¹	2.92	23.53	425.0	10.46	3.58	1.58	0.22	64.7
II ^{<}	3.24	26.15	382.4	7.76	4.00	1.37	0.02	7.5
I	3.63	29.28	341.5	9.44	3.65	1.23	0.03	10.0
II [⊥]	3.79	30.56	327.2	10.27	3.47	1.29	0.01	5.6
II ^{2*}	4.28	34.55	289.4	5.98	5.06	1.20	0.18	
*	4.46	35.99	277.9	6.70	4.70	1.50	0.26	

*Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

Примечание. E – энергия электронного перехода; ν – волновое число; λ – длина волны; ϵ – коэффициент молярного поглощения; W – полуширина; ρ – асимметрия; f – сила осциллятора; n – содержание таутомеров и конформеров. Содержание ПЛФ в ферменте – 87.8%. Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры II. Надстрочные индексы ([⊥], ⁾ относятся к двум конформерам структуры II (конформер с альдиминной связью, находящейся в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла, и конформер с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости пиридинового кольца, но сохраняющей сопряжение и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой кофермента).

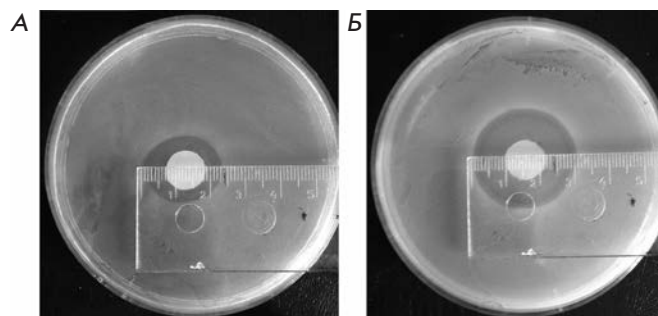


Рис. 2. Диффузия в агаре по методу Кирби–Бауэра [44]. На диск наносили смесь *C. sporogenes* МГЛ (10 мг/мл) и аллиина (2.5 мг/мл) в 100 мМ калий-фосфатном буфере. А – культура *C. freundii*. Б – культура *S. aureus*

и *S*-этил-*L*-цистеина объясняются наличием «кармана» для метильной группы аминокислот в активных центрах МГЛ.

Спектральные характеристики фермента

Спектр поглощения холофермента МГЛ *C. sporogenes* (рис. 1) при рН 8.0 сходен со спектром МГЛ *C. freundii* [23] с преобладающей полосой в области 422–425 нм, принадлежащей внутреннему альдимины в форме кетонамина (рис. 1, структура II). Как и у His-tag МГЛ *C. sporogenes* [24], спектр содержит интенсивную полосу поглощения с максимумом в области 502–505 нм, которую в спектрах комплексов ПЛФ-зависимых ферментов с аминокислотами и модельными соединениями приписывают хиноидному интермедиату [42].

Таблица 4. Ингибирование культур клеток бактерий смесями, содержащими МГЛ и сульфоксиды аминокислот

Сульфоксид аминокислоты	Зона ингибирования, мм ²			
	МГЛ <i>C. freundii</i>		МГЛ <i>C. sporogenes</i>	
	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>
(±)-Аллиин	380	754	254	754
(±)-L-MetO	452	491	177	227
(±)-S-Et-L-CysO	314	491	254	314
(±)-S-Et-L-HcyO	254	415	227	227

Разложение спектра холофермента с использованием логнормальных кривых в области 300–500 нм проводили согласно [23]. В табл. 3 приведены параметры полос поглощения, полученные в результате разложения. Внутренний альдимин, помимо кетонамина (рис. 1, структура II, $\epsilon = 10410 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), описывается минорными структурами, енольным таутомером (рис. 1, структура I) и двумя конформерами кетонамина, с альдиминной связью, перпендикулярной плоскости кольца кофермента (поглощает в области 380 нм), и с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости кольца, но сохраняющей сопряжение с π -электронами кофактора и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой ПЛФ (поглощает в области 327–328 нм). Ионная форма внутреннего альдимина и таутомерное равновесие практически такие же, как у МГЛ *C. freundii*. Идентификация поглощения в области 502–505 нм нуждается в дополнительных исследованиях.

Антимикробная активность смесей МГЛ *C. freundii* и *C. sporogenes* с сульфоксидами аминокислот

Антибактериальная активность смесей МГЛ из двух источников с сульфоксидами аминокислот проверена на культурах бактерий – грамположительной *S. aureus* и грамотрицательной *C. freundii* (табл. 4). Все смеси показали бактериостатический эффект в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Наиболее значительный эффект наблюдали для культуры *S. aureus* (рис. 2). Бактериостатический эффект был сравним с ингибированием роста бактериальных клеток канамицином. Зоны ингибирования канамицином (0.05 мг) и смесью,

содержавшей 0.04 мг аллицина, на культуре *C. freundii* составили 314 и 346 мм².

Таким образом, полученные данные показали, что клонированный фермент эффективно катализирует конверсию сульфоксидов аминокислот в тиосульфиды. Это позволяет предположить, что фармакологическая пара МГЛ и сульфоксид может обеспечить образование тиосульфидов в количествах, достаточных для терапевтических целей.

ВЫВОДЫ

МГЛ катализирует реакции γ - и β -элиминирования сульфоксидов – аналогов метионина и цистеина – с каталитическими эффективностями, сравнимыми с эффективностями реакций γ - и β -элиминирования этих аминокислот.

На твердой среде показано, что смеси МГЛ с сульфоксидами перспективны как антимикробные средства против грамположительных и грамотрицательных бактерий *in situ*.

Наибольший бактериостатический эффект смеси МГЛ с сульфоксидами аминокислот оказывают на грамположительную бактерию *S. aureus*, и бактериостатический эффект аллицина, полученного *in situ*, сравним с эффектом канамицина. ●

Авторы благодарят Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов за предоставленную возможность клонирования гена метионин- γ -лиазы из *Clostridium sporogenes*.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 15-14-00009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wentworth P., Datta A., Blakey D., Boyle T., Partridge L.J., Blackburn G.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 799–803.
- Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Kulikova V.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2014. V. 70. № 11. P. 3034–3042.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. P. 530–537.
- Фалеев Н.Г., Троицкая М.В., Ивойлов В.С., Карпова В.В., Беликов В.М. // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 3. С. 458–463.
- El-Sayed A.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 445–467.

6. Goyer A., Collakova E., Shachar-Hill Y., Hanson A.D. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 232–242.
7. Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // *Agric. Biol. Chem.* 1984. V. 48. P. 2367–2369.
8. Kreis W., Hession C. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. P. 1862–1865.
9. Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // *Infection Immunity.* 2000. V. 68. P. 6912–6916.
10. Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 42717–42727.
11. Lockwood B., Coombs G. // *Biochem. J.* 1991. V. 279. P. 675–682.
12. Coombs G.H., Mottram J.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. P. 1743–1745.
13. Yoshimura M., Nakano Y., Koga T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 292. P. 964–968.
14. Sato D., Kobayashi S., Yasui H., Shibata N., Toru T., Yamamoto M., Tokoro G., Ali V., Soga T., Takeuchi T., Suematsu M., Nozaki T. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010. V. 35. № 1. P. 56–61.
15. Han J., Lawson L., Han G., Han P. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 225. P. 157–160.
16. Stoll A., Seebeck E. // *Adv. Enzymol.* 1951. V. 11. P. 377–400.
17. Rabinkov A., Miron T., Konstantinovski L., Wilchek M., Mirelman D., Weiner L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1379. P. 233–244.
18. Rose P., Whiteman M., Moore P.K., Zhu Y.Z. // *Nat. Prod. Rep.* 2005. V. 22. P. 351–368.
19. Lynett P.T., Butts K., Vaidya V., Garrett G.E., Pratt D.A. // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 3320–3330.
20. Hirsch K., Danilenko M., Giat J., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D., Levy J., Sharoni Y. // *Nutr. Cancer.* 2000. V. 38. P. 245–254.
21. Shadkchan Y., Shemesh E., Mirelman D., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Osherov N. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. V. 53. P. 832–836.
22. Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A.J. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. V. 65. P. 79–89.
23. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Мамаева Д.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. С. 1272–1280.
24. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. С. 187–193.
25. Морозова Е.А., Куликова В.В., Яшин Д.В., Ануфриева Н.В., Анисимова Н.Ю., Ревтович С. В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Покровский В.С., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. № 3 (18). С. 96–102.
26. Nagai S., Flavim M. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 3884–3895.
27. Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 265. P. 317–332.
28. Mitsudome T., Takahashi Y., Mizugaki T., Jitsukawa K., Kaneda K. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 32. P. 8348–8351.
29. Frankel M., Gertner D., Jacobson H., Zilkha A. // *J. Chem. Soc.* 1960. P. 1390–1393.
30. Briggs W.H., Xiao H., Parkin K.L., Shen C., Goldman I.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. № 11. P. 5731–5735.
31. Waelsch H., Owades P., Miller H.K., Borek E. // *J. Biol. Chem.* 1946. V. 166. P. 273–281.
32. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
33. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Растрогруев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. V. 71. P. 454–463.
34. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
35. Dixon M. // *Biochem. J.* 1953. V. 55. P. 170–171.
36. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. P. 202–224.
37. Inoe H., Inagaki K., Adachi N., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. P. 2336–2343.
38. Nikulin A., Revtovich S., Morozova E., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M., Demidkina T. // *Acta Crystallography, Section D.* 2008. V. 64. P. 211–218.
39. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Хурс Е.Н., Закомырдина Л.Н., Никулин А.Д., Демидкина Т.В., Хомутов Р.М. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. С. 690–698.
40. Revtovich S.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2014. V. 101. P. 161–167.
41. Motoshima H., Inagaki K., Kumasaka T., Furuichi M., Inoue H., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka N., Yamamoto M., et al. // *J. Biochem.* 2000. V. 128. P. 349–354.
42. Metzler C.M., Harris A.G., Metzler D.E. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 4923–4933.
43. Esaki N., Nakayama T., Sawada S., Tanaka H., Soda K. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 3857–3862.
44. Bauer A.W., Kirb W.M.M., Sherris J.C., Turck M. // *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. V. 36. P. 493–496.

УДК 573.6

Химическое полисиалирование и *in vivo* тетрамеризация улучшают фармакокинетические характеристики биологических антидотов на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека

С. С. Терехов^{1*}, И. В. Смирнов^{1,3}, О. Г. Шамборант¹, Т. В. Бобик¹, Д. Г. Илюшин¹, А. Н. Мурашев², И. А. Дьяченко², В. А. Паликов², В. Д. Кнорре¹, А. А. Белогуров^{1,3,4}, Н. А. Пономаренко¹, Е. С. Кузина¹, Д. Д. Генкин⁵, Р. Masson³, А. Г. Габибов^{1,3,4}

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

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пушкино Московской обл.

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

⁴Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

⁵ОАО «Фармсинтез», 197110, Санкт-Петербург, ул. Красного Курсанта, 25ж

*E-mail: sterekhoff@gmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2015

РЕФЕРАТ Фосфорорганические токсины (ФОТ), благодаря их направленному действию на нервную систему, входят в число наиболее токсичных низкомолекулярных соединений. Бутирилхолинэстераза человека (чБуХЭ) является естественным биологическим антидотом широкого спектра ФОТ, что делает ее перспективной для разработки ДНК-кодируемых биологических антидотов. Высокие значения защитного индекса, полученные при использовании в терапии рекомбинантной чБуХЭ (рчБуХЭ), характерны для отравлений высокотоксичными боевыми ФОТ. В то же время широкомасштабное применение препаратов чБуХЭ ограничено из-за их высокой стоимости и экстремально быстрого выведения рчБуХЭ из кровотока. В представленной работе проанализированы два подхода к увеличению продолжительности циркуляции рчБуХЭ: I) химическое полисиалирование и II) *in vivo* тетрамеризация. При помощи обоих подходов удается значительно (более чем в 5 и 10 раз соответственно) повысить фармакокинетические характеристики рчБуХЭ, что позволяет использовать препараты на основе конъюгатов с полисиаловыми кислотами (рчБуХЭ-ПСА) и тетрамерной рчБуХЭ (4рчБуХЭ) в терапии отравлений ФОТ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биологический антидот, биологический препарат, биораспределение, бутирилхолинэстераза, полисиалирование, фармакокинетика, *in vivo* тетрамеризация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ФОТ – фосфорорганические токсины; чАцХЭ – ацетилхолинэстераза человека; 4рчБуХЭ – тетрамерная рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека; 4рчБуХЭ-ПСА – химически полисиалированная 4рчБуХЭ; MRT – Mean Residence Time (среднее время удержания); PRAD – Proline-Rich Attachment Domain (пролинбогатый домен связывания); ПСА – полисиаловые кислоты; cpm – counts per minute (распады в минуту).

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические токсины (ФОТ), несмотря на их более чем 150-летнюю историю, остаются одними из наиболее актуальных объектов современной токсикологии. ФОТ являются представителями нескольких классов фосфорорганических

соединений, необратимо ингибирующих ацетилхолинэстеразу человека (чАцХЭ). Ингибирование ацетилхолинэстеразы, в свою очередь, приводит к развитию синдрома SLUDGE(M) (Salivation Lacrimation Urination Diaphoresis Gastrointestinal upset Emesis (Miosis) – Слюноотделение Слезотечение

Мочеиспускание Потоотделение Расстройство кишечника Рвота (Миоз)). В случае тяжелых отравлений развиваются судороги, наблюдается необратимое повреждение мозга, остановка дыхания и наступает смерть. В настоящее время жертвами ФОТ (порядка 260000 в год) становятся главным образом самоубийцы. Особенно это актуально для западной части тихоокеанского региона, где составляет приблизительно 50% от общего числа попыток суицида [1]. Также случаи отравления фосфорорганическими пестицидами нередки среди фермеров. Кроме этого, существует потенциальная угроза военного применения боевых отравляющих веществ нервно-паралитического действия или использование их в террористических атаках. Общепринятая схема терапии отравлений ФОТ [2] включает комбинированную терапию антагонистами мускаринового рецептора (обычно атропином) и реактиваторами ацетилхолинэстеразы (пралидоксимом или обидоксимом). К сожалению, данная терапия не универсальна, она не приводит к увеличению выживаемости при отравлении фосфорорганическими пестицидами [3], а также не позволяет избежать необратимого повреждения мозга.

Альтернативным подходом в терапии отравлений ФОТ является использование биологических антидотов – биомолекул, связывающих и инактивирующих ФОТ [4–7]. Бутирилхолинэстераза человека – естественный биологический антидот (суицидальный инактиватор) человека при отравлении ФОТ [8]. Благодаря уникальному сходству с чАцХЭ и большому объему полости активного центра чБуХЭ инактивирует широчайший спектр ФОТ зачастую эффективнее чАцХЭ [9]. Использование чБуХЭ в терапии отравлений ФОТ позволяет не только повысить выживаемость, но и избежать долговременных побочных эффектов отравления ФОТ, в том числе и необратимого повреждения мозга [10]. Несмотря на очевидные преимущества, применение чБуХЭ в терапии отравлений ФОТ крайне ограничено высокой стоимостью препаратов чБуХЭ и экстремально быстрым выведением ($\tau_{1/2} \approx 2$ мин) мономерной и димерной рекомбинантной чБуХЭ (рчБуХЭ) из кровотока [11]. Таким образом, основные усилия в разработке эффективного терапевтического препарата были сосредоточены на повышении продукции рчБуХЭ [12] и улучшении фармакокинетики препаратов на ее основе за счет химической конъюгации с полиэтиленгликолем [13–16], полисиаловыми кислотами (ПСА) [17] или продукцией в виде рчБуХЭ, слитой с сывороточным альбумином человека [18]. Недавно мы показали [19], что высокого уровня продукции и одновременно более значительного увеличения фармакокинетических характеристик рчБуХЭ можно добиться за счет *in vivo* тетра-

меризации рчБуХЭ. Нами показано, что, имитируя естественный процесс тетрамеризации рчБуХЭ [20] в общепринятой экспрессионной системе клеток линии CHO, можно добиться эффективной биотехнологической продукции фармакологического препарата на основе тетрамерной рчБуХЭ (4рчБуХЭ). 4рчБуХЭ, полученная в результате *in vivo* тетрамеризации, обладала фармакокинетическими характеристиками ($\tau_{1/2}$ 32 ± 1.2 ч, MRT 43 ± 2 ч), сходными с препаратом тетрамерной чБуХЭ из плазмы крови человека [21].

Цель данной работы состояла в изучении возможности дальнейшего увеличения фармакокинетических характеристик препарата 4рчБуХЭ за счет химического полисиалирования, определении влияния полисиалирования на профиль биораспределения препаратов рчБуХЭ в мышинных моделях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биологические препараты рчБуХЭ, использованные в работе

4рчБуХЭ была получена в трансфицированных конструкцией pFUSE PRAD-F2A-BChE клетках линии CHO-K1, в которых одновременно экспрессируется ген пептида тетрамеризации (PRAD-пептид) и бутирилхолинэстеразы человека [19]. рчБуХЭ получена в виде смеси олигомеров [17] с преимущественным содержанием димерной формы. БуХЭ последовательно очищена методами аффинной хроматографии с использованием сорбента прокаинамид-сефарозы на колонке XK10/50 (GE Healthcare, США) и ионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50 (GE Healthcare, США). По данным электрофореза в полиакриламидном геле с окрашиванием Кумасси и окрашиванием на наличие специфической бутирилхолинэстеразной активности по методу Karnovsky и Roots [22] чистота белка превышала 95%.

Химическое полисиалирование препаратов рчБуХЭ

Препараты рчБуХЭ были химически конъюгированы с окисленными полисиаловыми кислотами со средней молекулярной массой 24 кДа (Xenetic Biosciences) по реакции восстановительного аминирования согласно [17, 23]. Конъюгацию проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 6.9, молярное соотношение рчБуХЭ : ПСА составляло 1 : 50 в расчете на мономер рчБуХЭ. Конечная концентрация NaN_3CN – 3 мг/мл. Реакцию проводили в течение 48 ч при 25°C. Полученный в результате конъюгат рчБуХЭ-ПСА очищали от побочных продуктов реакции многократным диализом с использованием концентраторов Amicon Ultra-15 30K (Millipore, США).

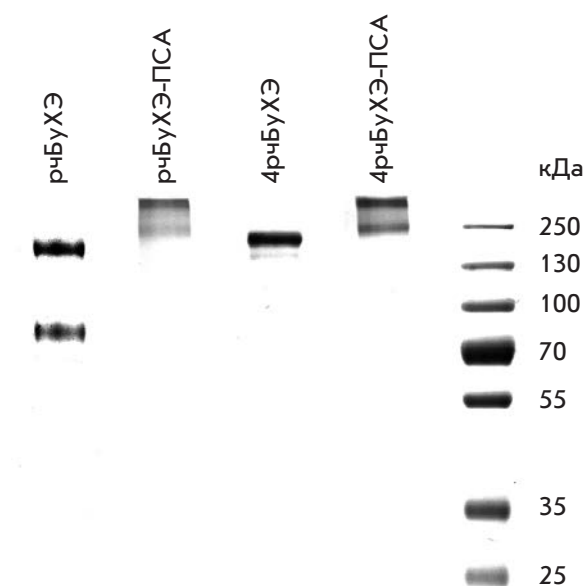


Рис. 1. Электрофоретический анализ препаратов белков и их конъюгатов с полисиаловыми кислотами (ПСА), использованных в работе. Разделение проводили в 8% ПААГ в не восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумасси R-250. Препарат рсБуХЭ присутствует в виде смеси мономерной, димерной и тетрамерной формы; препарат 4рсБуХЭ присутствует исключительно в форме тетрамера. Препараты полисиалированной бутирилхолинэстеразы имеют очевидно более высокую молекулярную массу, однако не фокусируются, этот эффект описан для химически полисиалированных препаратов [17]

Эффективность модификации определяли с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (с SDS, но без β -меркаптоэтанола). Концентрацию активной рсБуХЭ определяли по методу Элмана [24] с использованием 1 мМ бутирилтиохолин йодида (Sigma) и 0.5 мМ 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) (Sigma) в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 7.0, при 25°C. Образование продукта реакции, 5-тио-2-нитробензойной кислоты, регистрировали спектрофотометрически при длине волны 412 нм, исходя из коэффициента молярного поглощения продукта $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрацию БуХЭ оценивали исходя из удельной активности 720 единиц активности на 1 мг чистой БуХЭ.

Определение фармакокинетических параметров препаратов рсБуХЭ и конъюгатов рсБуХЭ-ПСА

Концентрацию препаратов рсБуХЭ, рсБуХЭ-ПСА, 4рсБуХЭ и 4рсБуХЭ-ПСА в плазме крови определяли с использованием четырех групп мышей линии BALB/c по 18 животных в каждой. Каждая группа состояла из трех подгрупп по шесть животных в каждой для временных интервалов 2 мин–3 ч (под-

группа I), 1 ч–3 дня (подгруппа II) и 1–8 дней (подгруппа III). Препараты БуХЭ вводили внутривенно в дозе 200 мкг/мышь (подгруппы I и II) и 500 мкг/мышь (подгруппа III). Образцы крови были отобраны из глазного синуса через 2, 5, 10, 15, 30 мин, 1, 2, 3, 6, 9, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 дней после введения. Концентрацию БуХЭ в сыворотке крови мышей определяли исходя из ее активности по методу Элмана [24]. Фармакокинетические характеристики препаратов получены исходя из аппроксимации кривой выведения БуХЭ в рамках двухкамерной модели [17] с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat software).

Определение профиля биораспределения препарата рсБуХЭ и конъюгата рсБуХЭ-ПСА

Радиоактивную метку ^{125}I в препараты рсБуХЭ и рсБуХЭ-ПСА вводили с использованием хлорамина Т в дозе $10^6 \text{ см}^2/\text{мг}$. Препараты меченой рсБуХЭ и рсБуХЭ-ПСА внутривенно вводили мышам линии BALB/c (три группы по шесть животных для каждого препарата) в дозе $10^5 \text{ см}^2/\text{мышь}$. Мышей умерщвляли спустя 0.5, 3 и 48 ч, образцы их крови и тканей отбирали и взвешивали. Отобранные образцы измеряли с использованием автоматического гамма-счетчика WIZARD (PerkinElmer). Накопление в ткани определяли как отношение удельной радиоактивности органа (срм/г) к удельной радиоактивности крови (срм/мл) в данный момент времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные успехи, связанные с терапевтическим применением препаратов рсБуХЭ, достигнуты при использовании рсБуХЭ, химически модифицированной полиэтиленгликолем. Ранее нами было показано [17], что химическое полисиалирование можно использовать в качестве альтернативной модификации, позволяющей многократно улучшить фармакокинетические характеристики рсБуХЭ. Конъюгаты рсБуХЭ с полисиаловыми кислотами (рсБуХЭ-ПСА) по своим фармакокинетическим характеристикам уступают конъюгатам с полиэтиленгликолем [12, 13, 15], однако имеют значительное преимущество перед ними в биоразлагаемости. В данной работе мы сравнили фармакокинетические характеристики препаратов рсБуХЭ-ПСА и 4рсБуХЭ без химической модификации [19], а также оценили влияние химического полисиалирования на фармакокинетику конъюгата 4рсБуХЭ-ПСА.

Полисиалирование рсБуХЭ и 4рсБуХЭ протекает с эффективностью более 95% и приводит к образованию высокомолекулярных продуктов со степенью модификации порядка шести молекул ПСА в расчете на мономер БуХЭ (рис. 1). Полученные в результате

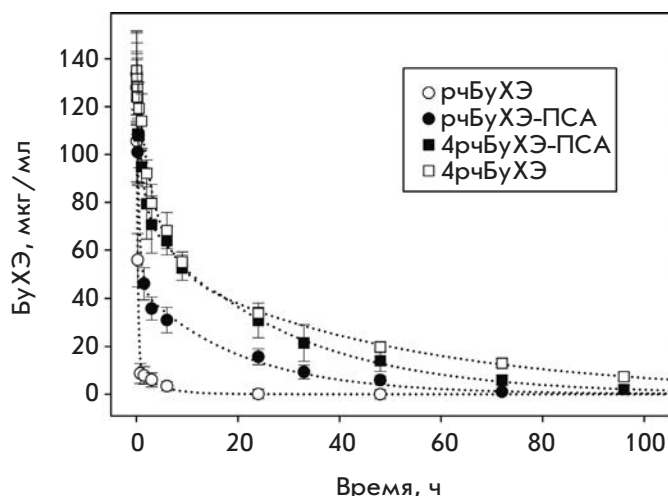


Рис. 2. Фармакокинетика выведения препаратов БухЭ из крови после внутривенного введения. Для оценки концентрации препаратов бутирилхолинэстеразы в плазме крови были использованы 4 группы мышей линии BALB/c по 18 животных в каждой, которым внутривенно были введены препараты рчБухЭ, рчБухЭ-ПСА, 4рчБухЭ и 4рчБухЭ-ПСА в дозе 200 и 500 мкг/мышь. Концентрация БухЭ в сыворотке крови мышей была определена исходя из ее активности по методу Элплмана. Фармакокинетические характеристики препаратов были получены исходя из аппроксимации кривой выведения фермента в рамках двухкамерной модели

конъюгаты рчБухЭ-ПСА и 4рчБухЭ-ПСА обладали низкой токсичностью и не вызывали гибель подопытных животных после внутривенного введения вплоть до дозы 1500 мг/кг, что, в свою очередь, может свидетельствовать о потенциальной возможности увеличения защитного индекса более чем на порядок относительно данных, полученных ранее для боевого отравляющего вещества VR [17].

Для оценки фармакокинетических характеристик полученных препаратов БухЭ использовали мышиную модель внутривенного введения препаратов и определение остаточной бутирилхолинэстеразной активности в сыворотке крови. Уровень эндогенной активности БухЭ в сыворотке крови мыши составлял 2.0 ± 0.5 мкг/мл, что позволило с высокой точностью оценивать концентрацию введенных препаратов. На рис. 2 представлены кривые выведения исследуемых препаратов. Очевидно, что практическое применение рчБухЭ без модификации в значительной степени затруднено ввиду ее крайне быстрой элиминации из кровотока. Модификация полисиаловыми кислотами позволяет более чем в 5 раз повысить фармакокинетические характеристики рчБухЭ (таблица), что значительно увеличивает об-

Фармакокинетические характеристики препаратов БухЭ

Препарат	Фармакокинетические характеристики		
	$\tau_{1/2распр.}$, ч	$\tau_{1/2вывед.}$, ч	MRT, ч
рчБухЭ	0.2 ± 0.1	3 ± 1	3 ± 1.6
рчБухЭ-ПСА	0.3 ± 0.1	14 ± 2	19 ± 3
4рчБухЭ	2.4 ± 0.3	33 ± 2	43 ± 4
4рчБухЭ-ПСА	0.8 ± 0.2	19 ± 2	27 ± 3

ласть ее терапевтического применения и позволяет использовать в качестве профилактики отравления ФОТ. В то же время 4рчБухЭ обладает характеристиками более чем в 2 раза лучшими по сравнению с конъюгатом рчБухЭ-ПСА, что делает ее лидером среди исследованных препаратов по продолжительности циркуляции. Биотехнологическое получение 4рчБухЭ аналогично рчБухЭ и значительно более целесообразно экономически, чем получение конъюгата рчБухЭ-ПСА, поскольку отсутствуют стадии модификации (где используется 50-кратный избыток ПСА) и очистки. В то же время можно было ожидать, что полисиалирование 4рчБухЭ приведет к еще большему увеличению фармакокинетических характеристик 4рчБухЭ, однако этого не происходит. Фармакокинетика выведения 4рчБухЭ-ПСА и 4рчБухЭ в первые сутки практически идентична, в дальнейшем 4рчБухЭ-ПСА выводится быстрее, чем немодифицированная 4рчБухЭ. Таким образом, химическое полисиалирование позволяет многократно повысить фармакокинетические характеристики мономерной и димерной рчБухЭ, но не улучшает фармакокинетику 4рчБухЭ. Так как рчБухЭ присутствует в плазме крови человека исключительно в тетрамерной форме, что обеспечивает ее продолжительную циркуляцию, а химическое полисиалирование 4рчБухЭ не приводит к улучшению фармакокинетических характеристик 4рчБухЭ-ПСА по сравнению с 4рчБухЭ, мы можем предположить, что увеличение продолжительности циркуляции препаратов 4рчБухЭ связано, в первую очередь, не с увеличением гидродинамического радиуса 4рчБухЭ. По-видимому, образование комплекса 4рчБухЭ приводит к маскировке доменов белка, ответственных за быструю элиминацию рчБухЭ.

С целью изучения влияния химического полисиалирования на профиль биораспределения и накопления препаратов 4рчБухЭ провели эксперименты с использованием препаратов, меченных радиоизотопом ^{125}I . Препараты 4рчБухЭ и 4рчБухЭ-ПСА вво-

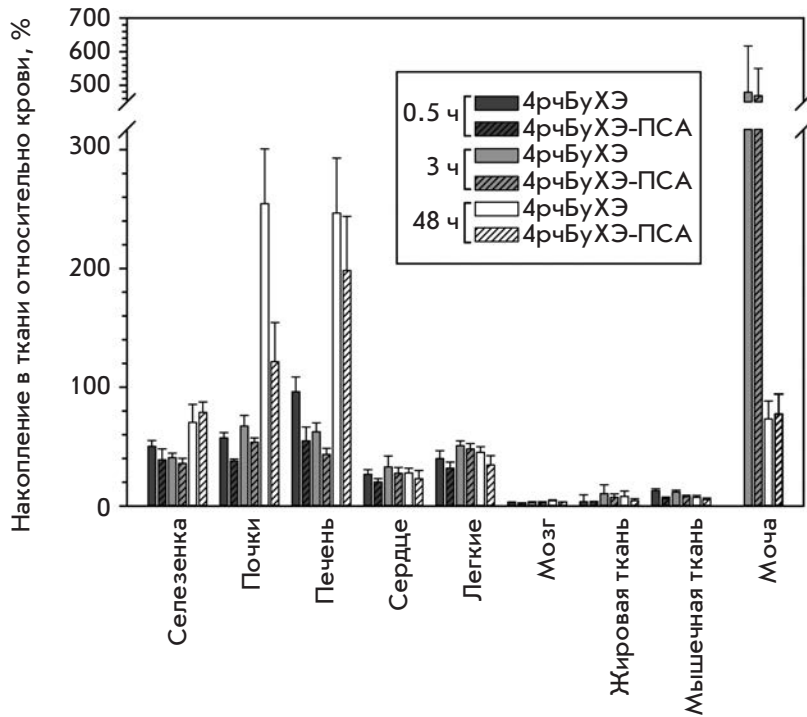


Рис. 3. Профили распределения препаратов 4rчБуХЭ и 4rчБуХЭ-ПСА, меченных ¹²⁵I, по органам, полученные через 0,5, 3 и 48 ч после внутривенного введения.

Препараты, меченные радиоактивным изотопом ¹²⁵I, были получены по стандартной методике с использованием хлорамина Т и очищены гель-фильтрацией. Для эксперимента использовали мышей линии BALB/c (3 группы по 6 животных для каждого препарата). Образцы вводились в хвостовую вену в дозировке 10⁵ cpm /мышь. Через 0,5, 3 или 48 ч животные подвергались эвтаназии. Выделяли соответствующие органы, взвешивали их и использовали для радиологического анализа с использованием прибора WIZARD Automatic Gamma Counter (PerkinElmer). Накопление в ткани определяли как отношение удельной радиоактивности органа (cpm/г) к удельной радиоактивности крови (cpm/мл) в данный момент времени

дили внутривенно, и анализировали их накопление в различных компартментах через 0,5, 3 и 48 ч относительно соответствующей радиоактивности образцов крови (рис. 3). Показано, что в течение первых 3 ч не наблюдается специфического накопления препаратов 4rчБуХЭ и 4rчБуХЭ-ПСА в органах, однако происходит ярко выраженное выведение с мочой, по-видимому, связанное с продуктами биodeградации препаратов. Накопление препаратов в почках и печени происходит спустя 48 ч и значительно более выражено у 4rчБуХЭ. Как уже отмечено ранее, фармакокинетика выведения 4rчБуХЭ и 4rчБуХЭ-ПСА крайне сходна в течение первых 24 ч, что проявляется также сходством профилей биораспределения. В то же время спустя 48 ч фармакокинетические свойства 4rчБуХЭ лучше по сравнению с 4rчБуХЭ-ПСА. По-видимому, это связано с более ярко выраженным накоплением 4rчБуХЭ в почках, что приводит к уменьшению скорости ее выведения. Наряду с этим можно отметить крайне низкую концентрацию препаратов rчБуХЭ в мозге, а также в жировой и мышечной ткани. Остаточная радиоактивность в этих компартментах, по-видимому, связана с наличием кровеносных сосудов, что говорит об ограниченной способности к проникновению, характерной для препаратов rчБуХЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной работы было изучение влияния альтернативных подходов к увеличению продолжитель-

ности циркуляции rчБуХЭ на фармакокинетику препаратов на ее основе. Улучшение фармакокинетических характеристик rчБуХЭ-ПСА по сравнению с rчБуХЭ, по-видимому, связано в первую очередь с увеличением гидродинамического радиуса rчБуХЭ-ПСА и маскировкой доменов rчБуХЭ (в частности, С-концевой домен чБуХЭ), ответственных за тетрамеризацию молекулами ПСА. Аналогичного эффекта можно добиться благодаря продукции 4rчБуХЭ. Использование 4rчБуХЭ представляет экономически привлекательную альтернативу препаратам на основе модифицированной rчБуХЭ, так как позволяет добиться более высоких фармакокинетических показателей, чем rчБуХЭ и rчБуХЭ-ПСА. Химическая модификация 4rчБуХЭ полисиаловыми кислотами в свою очередь не приводит к дальнейшему улучшению фармакокинетики 4rчБуХЭ-ПСА, что может свидетельствовать о существовании дополнительных естественных механизмов стабилизации 4rчБуХЭ. Вместе с тем, необходимо признать, что дальнейшая оптимизация реакции полисиалирования, полная стандартизация процесса химической модификации, а также использование предложенных недавно генетических конструкций для экспрессии [19] может вновь вывести rчБуХЭ-ПСА в лидеры среди потенциальных антидотов к ФОТ.

Низкая токсичность препаратов на основе 4rчБуХЭ позволяет расширить возможности применения биологических антидотов в терапии отрав-

лений ФОТ. В то же время стоит отметить, что использование препаратов 4рчБуХЭ ограничено необходимостью введения стехиометрических количеств фермента по отношению к ФОТ. Этот факт, в свою очередь, приводит к тому, что защитный индекс терапии 4рчБуХЭ (отношение LD_{50} животных после терапии к LD_{50} без терапии) может быть высоким лишь в случае боевых отравляющих веществ (т.е. высокотоксичных агентов с низкими значениями LD_{50}). Дальнейшее улучшение препаратов на основе 4рчБуХЭ, по-видимому, должно быть связано с созданием каталитических антидотов – ферментов, каталитически инактивирующих ФОТ. Это позволит многократно понизить терапевтическую дозу и расширить возможности данной терапии на случаи отравления пестицидами, так как в этом случае высокое значение LD_{50} приводит к необходимости введения чрезмерно высокого количества препарата

4рчБуХЭ. В то же время при переходе к каталитическим антидотам необходимо добиться быстрой и эффективной ($k_2/K_m \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$) элиминации ФОТ [13], что особенно актуально для терапии отравлений ФОТ [25, 26]. Немаловажное значение в случае разработки каталитического антидота будет иметь вопрос стандартизации клона с высокой продукцией, экономически оправданной для развертывания производства, а также его возможной сертификацией по требованиям FDA. В случае препаратов стехиометрических антидотов на основе рчБуХЭ, рассматриваемых в данной статье, последнее условие абсолютно выполнимо. ●

Работа поддержана грантом по контракту с Минобрнаукой России RFMEFI60414X0069 и частично (проведение радиологического анализа) грантом РФФИ № 14-04-00647.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gunnell D., Eddleston M., Phillips M.R., Konradsen F. // BMC Public Health. 2007. V. 7. P. 357.
- Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A.H. // Lancet. 2008. V. 371. P. 597–607.
- Eddleston M., Eyer P., Worek F., Juszczak E., Alder N., Mohamed F., Senarathna L., Hittarage A., Azher S., Jeganathan K., et al. // PLoS Med. 2009. V. 6. e1000104.
- Nachon F., Brazzotto X., Trovaslet M., Masson P. // Chem. Biol. Interact. 2013. V. 206. P. 536–544.
- Masson P., Lockridge O. // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 494. P. 107–120.
- Masson P., Rochu D. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 1. P. 68–79.
- Radic Z., Dale T., Kovarik Z., Berend S., Garcia E., Zhang L., Amitai G., Green C., Radic B., Duggan B.M., et al. // Biochem. J. 2013. V. 450. P. 231–242.
- Wille T., Thiermann H., Worek F. // Arch. Toxicol. 2014. V. 88. P. 301–307.
- Shenouda J., Green P., Sultatos L. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. V. 241. P. 135–142.
- Sun W., Doctor B.P., Lenz D.E., Saxena A. // Chem. Biol. Interact. 2008. V. 175. P. 428–430.
- Duysen E.G., Bartels C.F., Lockridge O. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. V. 302. P. 751–758.
- Huang Y.J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Cote M., Herskovits P., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 13603–13608.
- Geyer B.C., Kannan L., Garnaud P.-E., Broomfield C.A., Cadieux C.L., Cherni I., Hodgins S.M., Kasten S.A., Kelley K., Kilbourne J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 20251–20256.
- Rosenberg Y.J., Gearhart J., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S. // Chem. Biol. Interact. 2014. V. 210. P. 20–25.
- Sun W., Luo C., Tipparaju P., Doctor B.P., Saxena A. // Chem. Biol. Interact. 2013. V. 203. P. 172–176.
- Chilukuri N., Sun W., Naik R.S., Parikh K., Tang L., Doctor B.P., Saxena A. // Chem. Biol. Interact. 2008. V. 175. P. 255–260.
- Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1243–1248.
- Huang Y.J., Lundy P.M., Lazaris A., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Turcotte C., Cote M., Bellemare A., Bilodeau A.S., et al. // BMC Biotechnol. 2008. V. 8. P. 50.
- Terekhov S., Smirnov I., Bobik T., Shamborant O., Zenkova M., Chernolovskaya E., Gladkikh D., Murashev A., Dyachenko I., Palikov V., et al. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 51–59.
- Li H., Schopfer L.M., Masson P., Lockridge O. // Biochem. J. 2008. V. 411. P. 425–432.
- Saxena A., Ashani Y., Raveh L., Stevenson D., Patel T., Doctor B.P. // Mol. Pharmacol. 1998. V. 53. P. 112–122.
- Karnovsky M.J., Roots L. // J. Histochem. Cytochem. 1964. V. 12. P. 219–221.
- Smirnov I.V., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Genkin D.D., Deyev S.M., Gabibov A.G. // Methods in Molecular Biology. 2015. V. 1321. P. 389–404.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. P. 88–95.
- Worek F., Seeger T., Reiter G., Goldsmith M., Ashani Y., Leader H., Sussman J.L., Aggarwal N., Thiermann H., Tawfik D.S. // Toxicol. Lett. 2014. V. 231. P. 45–54.
- Worek F., Seeger T., Goldsmith M., Ashani Y., Leader H., Sussman J.S., Tawfik D., Thiermann H., Wille T. // Arch. Toxicol. 2014. V. 88. P. 1257–1266.

УДК 615.281.8

2-(2,4-Диокси-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-1-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамиды как новый класс ингибиторов репликации цитомегаловируса

Д. А. Бабков¹, М. П. Парамонова¹, А. А. Озеров¹, А. Л. Хандажинская², R. Snoeck³, G. Andrei³, М. С. Новиков^{1*}

¹Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

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

³Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven B-3000, Belgium

*E-mail: m-novikov1@mail.ru

Поступило в редакцию 25.05.2015

РЕФЕРАТ Осуществлен синтез серии производных урацила, содержащих в положении 3 пиримидинового цикла N-(4-феноксифенил)ацетамидный фрагмент, и изучена их противовирусная активность. Показано, что соединения этого ряда проявляют мощную ингибиторную активность в отношении цитомегаловируса человека (штаммы AD-169 и Davis) в культуре клеток HEL. Обнаружено, что некоторые соединения проявляют заметную активность в отношении вируса ветряной оспы-опоясывающего лишая (varicella zoster virus).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА производные урацила, синтез, противовирусная активность, цитомегаловирус человека. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ЦМВ – цитомегаловирус; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ГМДС – гексаметилдисилазан; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМФА – диметилформамид; ВЗВ – вирус ветряной оспы-опоясывающего лишая (varicella zoster virus).

Цитомегаловирус (ЦМВ) широко распространен в человеческой популяции, он обнаружен у жителей всех без исключения географических регионов, а также у представителей всех социально-экономических групп [1]. ЦМВ вызывает пожизненную латентную инфекцию, которая может периодически реактивироваться. У здоровых людей эта инфекция обычно протекает бессимптомно [2], тогда как у индивидов с пониженным иммунным статусом, в частности, у больных СПИДом [3] и реципиентов донорских органов, получающих иммуносупрессоры [4], с ЦМВ связана значительная заболеваемость и смертность. ЦМВ считается наиболее опасной причиной врожденных заболеваний. Вирус способен передаваться от матери к плоду, что приводит к мертворождению, врожденным дефектам и нарушениям развития [5].

При заболеваниях, вызванных ЦМВ, применяются ганцикловир, цидофовир и фоскарнет, а также их пролекарственные формы – валганцикловир и бринцидофовир [6]. Однако эти препараты вызывают множество нежелательных побочных эффектов [6]. Длительная терапия, проводимая при ЦМВ-инфекции, может приводить к возникновению устойчивых вариантов ЦМВ [7], поэтому поиск новых высокоэффективных анти-ЦМВ-агентов представляет актуальную задачу.

Недавно мы получили ряд 1-циннамил-3-бензил-производных урацила, которые эффективно блокировали репликацию ВИЧ-1 и ЦМВ в клеточных культурах [8], а также описали синтез и охарактеризовали свойства 1-[ω-(фенокси)алкил]производных урацила как анти-ЦМВ-агентов [9]. В продолжение работы по поиску новых ингибиторов

репликации ЦМВ нами синтезированы производные урацила, содержащие 4-феноксиацетанилидный фрагмент в положении 3 остатка пиримидинового основания, и изучены их противовирусные свойства.

2-Хлор-N-(4-феноксифенил)ацетамид (1)

Суспензию 3.9 г (21.06 ммоль) 4-(фенокси)анилина (2) и 0.15 г NH_4Cl в 25 мл ГМДС кипятили в течение 12 ч до образования прозрачного раствора. Избыток ГМДС удаляли при пониженном давлении, к остатку (маслянистая жидкость темного цвета) добавляли 50 мл безводного 1,2-дихлорэтана, а затем к раствору при 0°C по каплям прибавляли 1.7 мл (21.37 ммоль) хлорацетилхлорида. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч и оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем реакционную массу упаривали при пониженном давлении на ротаторном испарителе и перекристаллизовывали из смеси этилацетат-гексан (1 : 1). Полученный продукт представлял собой мелкокристаллическое вещество светло-лилового цвета (выход 80%), $T_{\text{пл}}$ 105–106°C, R_f 0.62 (этилацетат-гексан, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д., J (Гц): 4.24 (2H, s, COCH_2), 6.97 (2H, d, $J = 8.7$, H-3', H-5'), 7.00 (2H, d, $J = 9.0$, H-2'', H-6''), 7.10 (1H, t, $J = 7.4$, H-4''), 7.36 (2H, t, $J = 8.5$, H-3'', H-5''), 7.61 (2H, d, $J = 9.0$, H-2', H-6'), 10.30 (1H, s, NH). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 47.7, 122.2, 123.6, 125.4, 134.2, 138.5, 156.6, 161.4, 168.7.

Общая методика синтеза 2-(2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамидов (4)–(11)

Смесь 1.42 ммоль соответствующего 1-замещенного урацила (12)–(19) и 0.29 г (2.10 ммоль) K_2CO_3 в растворе 10 мл ДМФА перемешивали при 80°C в течение 1 ч, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2.12 ммоль 2-хлор-N-(4-феноксифенил)ацетамида (1) и перемешивали при той же температуре в течение 24 ч. Затем реакционную массу фильтровали, упаривали в вакууме и очищали флэш-хроматографией с последующей перекристаллизацией продукта из смеси этилацетат-гексан (1 : 1).

2-(3-Бензил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамид (4)

Выход 85%, $T_{\text{пл}}$ 186–187°C, R_f 0.60 (1,2-дихлорэтан-этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д., J (Гц): 4.21 (2H, s, CH_2), 4.53 (2H, s, CH_2), 5.38 (1H, d, $J = 7.8$, H-5), 6.51–6.56 (4H, m, H-4', H-3', H-5', H-4''), 6.65 (2H, d, $J = 8.5$, H-2', H-6'), 6.84–6.94 (6H, m, H-3'', H-5'', H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.15 (2H, d, $J = 8.9$, H-2'', H-6''), 7.43 (1H, d, $J = 7.8$, H-6), 9.88 (1H, s, NH). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 42.9, 51.0, 100.1,

117.5, 119.1, 120.3, 122.6, 127.1, 127.4, 128.3, 129.5, 134.3, 136.1, 144.1, 150.8, 151.4, 156.9, 161.8, 164.7.

2-[3-(4-Метилбензил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]-N-(4-феноксифенил)ацетамид (5)

Выход 83%, $T_{\text{пл}}$ 193–194°C, R_f 0.54 (1,2-дихлорэтан-этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д., J (Гц): 2.29 (3H, s, CH_3), 4.65 (2H, s, CH_2), 4.92 (2H, s, CH_2), 5.80 (1H, d, $J = 7.8$, H-5), 6.98 (2H, d, $J = 8.5$, H-3', H-5'), 7.00 (2H, d, $J = 8.9$, H-2', H-6'), 7.10 (1H, dt, $J = 7.3$ и 1.0, H-4''), 7.19 (2H, d, $J = 7.9$, H-2'', H-6''), 7.23 (2H, d, $J = 7.8$, H-3'', H-5''), 7.36 (2H, dt, $J = 7.4$ и 1.2, H-3''', H-5'''), 7.60 (2H, d, $J = 8.8$, H-2'', H-6''), 7.84 (1H, d, $J = 8.0$, H-6), 10.25 (1H, s, NH). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 24.9, 47.5, 55.4, 104.7, 122.2, 123.7, 125.0, 127.2, 131.8, 133.4, 134.2, 137.7, 138.9, 141.3, 148.6, 155.4, 156.1, 161.6, 166.4, 169.3.

2-[3-(3,5-Диметилбензил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]-N-(4-феноксифенил)ацетамид (6)

Выход 79%, $T_{\text{пл}}$ 99–101°C, R_f 0.53 (1,2-дихлорэтан-этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д., J (Гц): 2.24 с (6H, CH_3), 4.64 с (2H, CH_2), 4.87 с (2H, CH_2), 5.80 д (1H, $J = 7.9$, H-5), 6.92 с (3H, H-2', H-4', H-6'), 6.96 д (2H, $J = 8.0$, H-2'', H-6''), 6.98 д (2H, $J = 8.9$, H-3'', H-5''), 7.09 т (1H, $J = 7.3$, H-4''), 7.35 т (2H, $J = 7.8$, H-3''', H-5'''), 7.58 д (2H, $J = 8.8$, H-2'', H-6''), 7.82 д (1H, $J = 7.9$, H-6), 10.29 с (1H, NH). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 25.1, 47.5, 55.6, 104.7, 122.1, 123.7, 124.9, 127.2, 129.5, 133.4, 134.2, 138.9, 140.5, 142.0, 148.7, 155.4, 156.1, 161.5, 166.4, 169.3.

2-(3-Циннамил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамид (7)

Выход 88%, $T_{\text{пл}}$ 184–185°C, R_f 0.41 (1,2-дихлорэтан-этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д., J (Гц): 4.54 (2H, d, $J = 5.6$, CH_2), 4.64 (2H, s, CH_2), 5.81 (1H, d, $J = 8.0$, H-5), 6.34 (1H, dt, $J = 6.0$, =CH-), 6.60 (1H, d, $J = 16.0$, PhCH=), 6.96 (2H, d, $J = 7.8$, H-3'', H-5''), 6.98 (2H, d, $J = 8.9$, H-2'', H-6''), 7.09 (1H, t, $J = 7.3$, H-4''), 7.25 (1H, t, $J = 7.4$, H-4'), 7.33 (2H, t, $J = 7.8$, H-3''', H-5'''), 7.35 (2H, t, $J = 8.4$, H-3', H-5'), 7.43 (2H, d, $J = 7.5$, H-2', H-6'), 7.58 (2H, d, $J = 8.9$, H-2'', H-6''), 7.77 (1H, d, $J = 7.8$, H-6), 10.28 (1H, s, NH). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 47.4, 54.2, 104.7, 122.1, 123.7, 125.0, 127.2, 128.0, 130.7, 132.2, 132.9, 134.2, 137.0, 138.9, 140.1, 148.4, 155.2, 156.1, 161.5, 166.5, 169.3.

2-[3-(Нафт-1-илметил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]-N-(4-феноксифенил)ацетамид (8)

Выход 85%, $T_{\text{пл}}$ 197–198.5°C, R_f 0.57 (1,2-дихлорэтан-этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.,

J (Гц): 4.72 (2H, s, CH₂), 5.49 (2H, s, CH₂), 5.85 (1H, d, $J = 8.0$, H-5), 6.99 (2H, d, $J = 7.8$, H-3'', H-5''), 7.02 (2H, d, $J = 9.0$, H-2'', H-6''), 7.11 (1H, t, $J = 7.3$, H-4'''), 7.36 (1H, d, $J = 7.1$, H-4'), 7.37 (2H, dt, $J = 8.6$ и 0.9 , H-3''', H-5'''), 7.51 (1H, t, $J = 7.9$, H-6'), 7.57–7.63 (4H, m, H-3', H-7', H-2''', H-6'''), 7.76 (1H, d, $J = 7.8$, H-6), 7.92 (1H, d, $J = 8.3$, H-8'), 7.99 (1H, d, $J = 7.7$, H-4'), 8.12 (1H, d, $J = 8.2$, H-5'), 10.28 (1H, s, NH). ¹³C-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д.: 47.6, 53.2, 105.1, 122.2, 123.7, 125.0, 127.2, 129.1, 129.7, 130.4, 130.9, 132.5, 132.9, 134.2, 134.6, 136.1, 137.6, 138.9, 148.3, 155.6, 156.2, 161.6, 166.4, 169.3.

2-[3-[2-(Феноксипиримидин-1(2H)-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамид (9)

Выход 90%, $T_{\text{пл}}$ 154–155°C, R_f 0.46 (1,2-дихлорэтан–этилацетат, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д., J (Гц): 4.16 (2H, d, $J = 5.4$, NCH₂), 4.21 (2H, d, $J = 5.4$, OCH₂), 4.64 (2H, s, CH₂), 5.78 (1H, d, $J = 8.0$, H-5), 6.94–7.00 (7H, m, H-2', H-4', H-6', H-2'', H-3'', H-5'', H-6'''), 7.10 (1H, t, $J = 7.3$, H-4'''), 7.29 (2H, t, $J = 7.9$, H-3''', H-5'''), 7.36 (2H, t, $J = 7.6$ и 1.2 , H-3', H-5'), 7.59 (2H, d, $J = 8.9$, H-2''', H-6'''), 7.78 (1H, d, $J = 7.9$, H-6), 10.24 (1H, s, NH). ¹³C-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д.: 29.7, 47.4, 52.4, 69.4, 104.0, 118.9, 122.2, 123.7, 125.0, 125.3, 127.2, 133.8, 134.1, 138.9, 149.3, 155.4, 156.2, 161.6, 162.2, 166.4, 169.3.

2-[3-(Бензилоксиметил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]-N-(4-феноксифенил)ацетамид (10)

Выход 84%, $T_{\text{пл}}$ 163–164°C, R_f 0.47 (1,2-дихлорэтан–этилацетат, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д., J (Гц): 4.59 (2H, s, CH₂), 4.63 (2H, s, CH₂), 5.26 (2H, s, CH₂), 5.83 (1H, d, $J = 7.8$, H-5), 6.96 (2H, d, $J = 7.9$, H-3'', H-5''), 6.99 (2H, d, $J = 8.9$, H-2'', H-6''), 7.09 (1H, dt, $J = 7.6$ и 1.0 , H-4'''), 7.26–7.38 (7H, m, C₆H₅, H-3''', H-5'''), 7.59 (2H, d, $J = 9.1$, H-2''', H-6'''), 7.84 (1H, d, $J = 8.0$, H-6), 10.32 (1H, s, NH). ¹³C-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д.: 43.2, 70.4, 77.2, 100.9, 117.9, 119.5, 120.7, 123.0, 127.69, 127.74, 128.3, 130.0, 134.7, 137.4, 143.8, 151.3, 151.9, 157.4, 162.1, 165.1.

2-(3-Пропаргил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-N-(4-феноксифенил)ацетамид (11)

Выход 81%, $T_{\text{пл}}$ 226–228°C, R_f 0.68 (1,2-дихлорэтан–этилацетат, 1 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (ДМСО-D₆), δ , м.д., J (Гц): 3.42 (1H, s, ≡CH), 4.59 (2H, s, CH₂), 4.60 (2H, d, $J = 8.0$, CH₂), 5.81 (1H, d, $J = 8.0$, H-5), 6.95 (2H, d, $J = 7.7$, H-3'', H-5''), 6.98 (2H, d, $J = 8.9$, H-2'', H-6''), 7.08 (1H, t, $J = 7.6$, H-4'''), 7.35 (2H, dt, $J = 8.5$ и 1.1 , H-3''', H-5'''), 7.56 (2H, d, $J = 8.9$, H-2''', H-6'''), 7.80 (1H, d, $J = 7.9$, H-6), 10.33 (1H, s, NH). ¹³C-ЯМР-спектр

(ДМСО-D₆), δ , м.д.: 42.0, 47.4, 80.3, 82.4, 105.1, 122.1, 123.7, 125.0, 127.3, 134.2, 138.8, 147.6, 154.8, 156.1, 161.5, 166.3, 169.2.

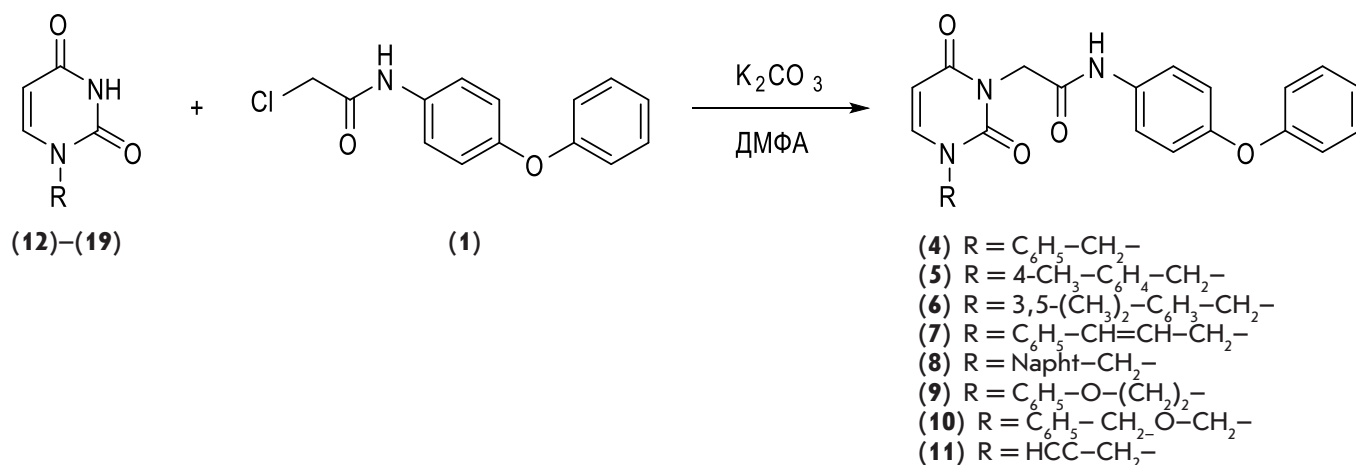
Противовирусные исследования

Оценивали активность соединений в отношении следующих вирусов: вируса герпеса простого типа 1 (ВПГ-1) штамм KOS с дефицитом тимидинкиназы (TK⁻), ВПГ-1 штамм KOS, резистентного к ацикловиру (ACV^r), вируса герпеса простого типа 2, штаммы Lyons и G, ЦМВ (штаммы AD-169 и Davis), вируса ветряной оспы-опоясывающего лишая (ВЗВ, штаммы ОКА и YS), вируса осповакцины штамм Lederle, респираторно-сицитиального вируса (штамм Long), вируса везикулярного стоматита, вируса Коксаки В4, вируса парагриппа 3, вируса гриппа А (подтипы H1N1, H3N2), вируса гриппа В, реовируса-1, вируса Синдбис и вируса Пунта Торо. Исследования проводили в соответствии с [9].

Исходный 2-хлор-N-(4-феноксифенил)ацетамид (**1**) синтезирован в соответствии с условиями, разработанными нами ранее [10]. Производные урацила, содержащие заместитель у атома азота N¹ (**12**)–(**19**), получены конденсацией эквимольных количеств 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидина и арилметилхлорида/бромиды в соответствии с [8]. Обработка эквимольным количеством хлорида (**1**) в растворе ДМФА в присутствии K₂CO₃, как показано на схеме, вела к получению целевых 4-феноксиацетанилидов (**4**)–(**11**), выход которых составил 79–90%.

Анти-ЦМВ-свойства производных урацила (**4**)–(**11**) были изучены в культуре клеток HEL в отношении ЦМВ (штаммы AD-169 и Davis). Обнаружено, что некоторые соединения этой серии проявляют мощную ингибиторную активность в отношении ЦМВ, сравнимую с действием ганцикловира. Наиболее активными оказались производные урацила, содержащие в положении 1 пиримидинового кольца бензильный (соединение (**4**)) и 3,5-диметилбензильный (соединение (**6**)) заместители. Они ингибировали репликацию ЦМВ в интервале концентраций EC₅₀ = 3.06–8.9 мкМ. Другие модификации структуры сопровождались полной потерей ингибиторной активности.

Обнаружено также, что соединения (**4**) и (**6**) проявляют заметную активность в отношении ВЗВ. Соединения блокировали репродукцию ВЗВ (штамм ОКА) в культуре клеток HEL в концентрации EC₅₀ = 8.18 мкМ (соединение (**4**)) и 17.0 мкМ (соединение (**6**)), что уступает защитному действию ацикловира (EC₅₀ = 1.33 мкМ) и бривудина (EC₅₀ = 0.026 мкМ), применяемых при инфекциях, вызванных этим вирусом [11]. Однако устойчивый к действию ацикловира и бривудина мутантный



Схема

штамм ВЗВ (07-1), характеризующийся дефицитом тимидинкиназы, был чувствителен к 1-бензил-3-ацетанилид-производным урацила: EC₅₀ = 6.68 мкМ (соединение (4)) и 16.1 мкМ (соединение (6)).

Таким образом, производные урацила, синтез которых описан в данной работе, представляют собой новый класс ингибиторов репродукции ЦМВ, сравнимый с действием ганцикловира. Кроме того, некоторые соединения данного ряда проявляют выраженный ингибиторный эффект в отношении ВЗВ –

как штамма дикого типа (ОКА), так и штамма (07-1), устойчивого к действию ацикловира. Полученные данные показывают перспективность данного направления для поиска новых эффективных противовирусных средств. ●

*Работа поддержана РФФИ
 (грант № 13-04-01391_A), биологическая часть
 работы поддержана грантом GOA 10/014.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. // Rev. Med. Virol. 2010. V. 20. P. 202–213.
- Gandhi M.K., Khanna R. // Lancet Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 725–738.
- Baroco A.L., Oldfield E.C. // Curr. Gastroenterol. Rep. 2008. V. 10. P. 409–416.
- Nashan B., Gaston R., Emery V., Säemann M.D., Mueller N.J., Couzi L., Dantal J., Shihab F., Mulgaonkar S., Seun K.Y., et al. // Transplantation. 2012. V. 93. P. 1075–1085.
- Dollard S.C., Grosse S.D., Ross D.S. // Rev. Med. Virol. 2007. V. 17. P. 355–363.
- Ahmed A. // Infect Disord Drug Targets. 2011. V. 5. P. 475–503.
- Lurain N.S., Chou S. // Clin. Microb. Rev. 2010. V. 23. P. 689–712.
- Novikov M.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Paramonova M.P., Ivanov A.V., Gavryushov S.A., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Andrei G., et al. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 1150–1158.
- Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 4151–4157.
- Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Chizhov A.O., Khandazhinskaya A.L., Seley-Radtke K.L. // Tetrahedron Lett. 2013. V. 54. P. 576–578.
- De Clercq E. // Med. Res. Rev. 2005. V. 25. P. 1–20.

УДК 576.4

Мутации в гене *PARK2*, ассоциированном с болезнью Паркинсона, сопровождаются разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели

Е. В. Коновалова¹, О. М. Лопачева^{1,2}, И. А. Гривенников³, О. С. Лебедева³,
Э. Б. Даширмаев⁴, Л. Г. Хаспеков¹, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин^{1*}

¹Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

²Международный учебно-научный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

³Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: snillario@gmail.com

Поступило в редакцию 04.06.2015

РЕФЕРАТ Болезнь Паркинсона обусловлена дегенерацией дофаминергических нейронов среднего мозга. Причиной редкой рецессивной формы этого заболевания могут быть мутации гена *PARK2*, продукт которого, паркин, контролирует процессы митофагии и программируемой клеточной гибели. Определен уровень про- и антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 в дофаминергических нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток здорового донора и пациента с болезнью Паркинсона – носителя мутаций *PARK2*. Методом Вестерн-блоттинга проанализированы соотношения белков Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W. Показано, что уровень проапоптотического белка Bax в *PARK2*-нейронах вдвое ниже по сравнению со здоровыми клетками. Напротив, экспрессия антиапоптотических факторов Bcl-XL, Bcl-W и Bcl-2 статистически значимо увеличена в мутантных клетках по сравнению со здоровыми дофаминергическими нейронами. Полученные результаты показывают, что мутации *PARK2* сопровождаются разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели, в которой ведущая роль принадлежит неапоптотическим молекулярным механизмам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, дофаминергические нейроны, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, *PARK2*, мутации, программируемая клеточная гибель.

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, обусловленное поражением пигментированных нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга и дегенерацией дофаминергического nigrostriatalного пути. Лечение при БП носит лишь симптоматический характер и не предотвращает дальнейшей гибели nigralных клеток, что диктует необходимость идентификации ключевых звеньев патогенетического каскада болезни [1].

В развитии БП важная роль принадлежит генетике. Примерно 10% всех случаев БП представлены моногенными формами [1, 2], а остальные (спорадические) случаи имеют многофакторную природу. На сегодняшний день известно 20 генетических локусов БП [2]. Один из вовлекаемых генов, *PARK2*,

расположен на хромосоме 6q25.2-27 и связан с развитием особой формы болезни – аутосомно-рецессивной БП, манифестирующей в раннем возрасте [3]. Мутации *PARK2* обуславливают около 15% семейных и 4% спорадических случаев БП с дебютом до 40 лет [3–5]. Ген *PARK2* кодирует белок паркин – цитозольную убиквитин-Е3-лигазу. Основная роль паркина состоит в регуляции митофагии, осуществляемой вместе с митохондриальным белком PINK1 – продуктом еще одного гена аутосомно-рецессивного паркинсонизма [6]. Последовательность молекулярных событий выглядит следующим образом: нефункциональная митохондрия деполяризуется и тем самым стабилизирует PINK1, после чего тот захватывает паркин из цитозоля и активирует его при доставке к митохондрии за счет PINK1-киназой

активности; далее активированный паркин обеспечивает селективную аутофагию поврежденной органеллы [7].

Таким образом, взаимодействуя друг с другом, паркин и PINK1 осуществляют контроль состояния митохондрий. В настоящее время паркин рассматривается в качестве поливалентного нейропротекторного агента, имеющего ключевое значение для выживания дофаминергических нейронов при воздействии различных нейротоксинов [8].

Изучение клеточной биологии и нейрохимии PARK2/паркина является чрезвычайно актуальным направлением современной неврологии. Объектом наших исследований стал мутантный паркин, экспрессируемый в клетках пациента с редкой PARK2-ассоциированной формой БП. В качестве модельной системы была выбрана культура обогащенных дофаминергическими нейронами нервных клеток, полученных в результате репрограммирования фибробластов кожи в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) и их последующей направленной дифференцировки [9, 10]. С целью уточнения патогенеза болезни мы изучали динамику ряда про- и антиапоптотических факторов в мутантной культуре в сопоставлении с культурой нейронов, полученных от здорового донора.

В работе использовали культуры клеток здорового донора и пациента с аутосомно-рецессивной ювенильной БП, носителя компунд-гетерозиготных мутаций в гене PARK2 (del202-203AG и IVS1+1G/A). Из биоптатов кожи донора и пациента ранее нами были получены фибробласты, которые репрограммировали при помощи оригинальных лентивирусных векторов с факторами плюрипотентности (LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4) с целью получения клонов ИПСК. Далее клетки были дифференцированы по нейрональному типу с использованием факторов дифференцировки. Методики получения фибробластов и их репрограммирования, а также индукции дифференцировки ИПСК в специализированные дофаминергические нейроны описаны ранее [10].

Дифференцировку клеток в нейроны подтверждали с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к β -III-тубулину и тирозингидроксилазе (ТН). Вестерн-блоттинг для определения содержания белков в клеточных культурах проводили по стандартной методике.

Результаты обрабатывали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism 6.

Клеточные линии Po2 и Tr5 при дифференцировке экспрессировали нейрональные маркеры, которые выявляли при помощи иммуноцитохимического окрашивания (рис. 1). Белок β -III-тубулин является

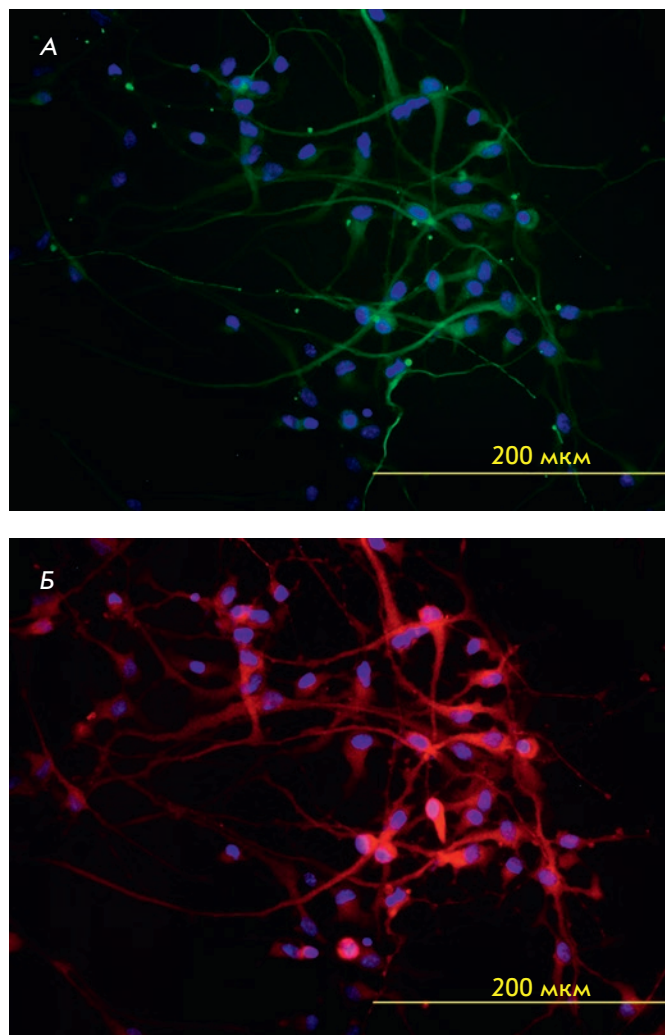


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание нейронов, дифференцируемых из ИПСК. А – окраска на β -III-тубулин (зеленый цвет); Б – окраска на ТН (красный цвет); синим цветом обозначены ядра клеток (маркер DAPI)

классическим маркером ранней нейрональной дифференцировки, а ТН традиционно рассматривается как специфический маркер дифференцировки нейронов по дофаминергическому пути. Как видно из рис. 1, дифференцировке подвергаются все ИПСК, поскольку все ядра клеток, окрашенные DAPI, находятся в нейронах (позитивных по β -III-тубулину и ТН). Количество нейронов, дифференцированных по дофаминергическому пути, составляет около 80% от общего количества клеток, позитивных по β -III-тубулину.

Оказалось, что соотношение про- и антиапоптотических факторов в клеточных культурах Po2 и Tr5, полученных соответственно от здорового до-

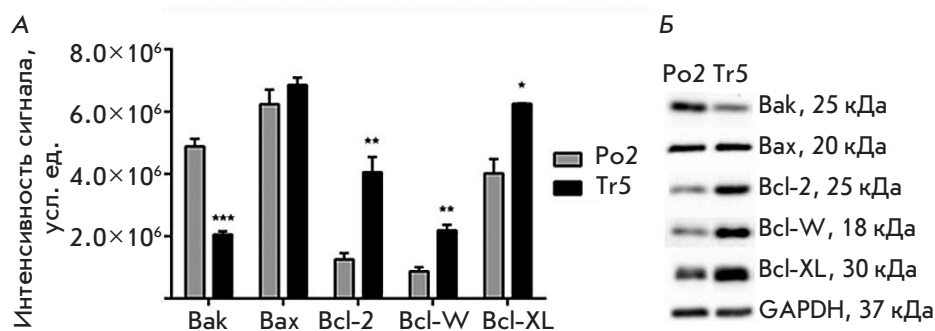


Рис. 2. Количественный анализ про- и антиапоптотических белков в клеточной культуре Po2, полученной от здорового донора, и в культуре Tr5, полученной от пациента с БП – носителя мутаций в гене *PARK2* (Вестерн-блоттинг). **А** – интенсивность сигнала (в условных единицах) от полос Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-W и Bcl-XL ($n = 3$). $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) и $p < 0.05$ (*) при сравнении культур Po2 и Tr5. **Б** – репрезентативные фотографии полос, полученных при проведении Вестерн-блоттинга

нора и носителя мутаций в гене *PARK2*, различается (рис. 2).

Концентрация проапоптотического белка Bak в мутантных дофаминергических нейронах Tr5 была статистически значимо ниже (на 58%), чем в клетках здорового донора в культуре Po2 ($p < 0.001$). Значимых различий в содержании проапоптотического белка Bax в изучаемых культурах клеток не обнаружено.

Содержание антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-W и Bcl-XL оказалось статистически значимо более высоким в клетках Tr5, экспрессирующих мутантный *PARK2*. Так, концентрация белка Bcl-2 в мутантных клетках была на 222% выше, чем в клетках дикого типа, белка Bcl-W – на 150.5% (в обоих случаях $p < 0.01$), а белка Bcl-XL – на 55% ($p < 0.05$).

Каждая проба содержала 20 мкг общего белка. Равномерность нанесения белка на гель дополнительно контролировали с использованием белка GAPDH, уровень сигнала которого во всех образцах был одинаковым (рис. 2Б).

Описано несколько вариантов программируемой клеточной гибели при БП и других нейродегенеративных заболеваниях – классический апоптоз, аутофагический путь, AIF/PARP-зависимый путь, паратоз и др. [11, 12]. В ряде случаев, однако, закономерности клеточной гибели не соответствуют какому-то одному механизму и имеют комплексный характер. Важную роль в клеточной гибели играет высвобождение из митохондрий цитохрома с [13]. Цитохром с активирует цитозольный белок Araf-1 и прокаспазу-9 по пути формирования апоптосомы, и его выброс строго регулируется соотношением в клетке про- и антиапоптотических факторов. Дисбаланс в данной системе, выявленный нами в *PARK2*-скомпромитированных нейронах, может быть связан с функциональными свойствами дефектного паркина, но это предположение нуждается в до-

полнительном подтверждении на культурах с нормальным и мутантным генотипами.

Белок паркин действует как митохондриальный нейропротектор. Установлено, в частности, специфическое автономное влияние паркина на митохондриальные механизмы, определяющие высвобождение цитохрома с и запуск реакций апоптоза [14]. Недавно идентифицирован паркиноподобный цитоплазматический белок, ассоциированный с p53 (PARC): как и паркин, он является E3-лигазой и инициирует протеасомную деградацию цитохрома с [15]. Важным этапом защитного действия паркина может быть протеасомная деградация ARTS – митохондриального белка, инициирующего ранний (до выделения цитохрома с) этап каспазного пути [16]. Тем не менее детальные молекулярные механизмы нейропротекции, ассоциированные с паркином, остаются не до конца ясными.

Особенность культуры Tr5 состоит в отсутствии нормального паркина, поскольку нейроны данной культуры несут две инактивирующие рецессивные мутации гена *PARK2* (делецию со сдвигом рамки del202-203AG и мутацию сплайсинга IVS1+1G/A). Таким образом, в мутантной культуре нарушен селективный процессинг митохондриальных белков и цитохрома с, осуществляемый паркином. При этом в культуре Tr5 вместо ожидаемой инициации апоптоза нами выявлено статистически значимое снижение концентрации проапоптотического белка Bak и, напротив, повышение уровня всех исследованных антиапоптотических белков семейства Bcl. Полученные результаты сходны с данными о повышении уровня Bcl-XL *in vivo* и *in vitro* в модели индуцированного паракватом паркинсонизма [17]. Одной из функций паркина считается предотвращение транслокации апоптотического белка Bax в митохондрии [18], однако нарушение регуляции этого процесса в *PARK2*-мутантных клетках не затраги-

вает экспрессию Вах и может не сопровождаться изменением его уровня в культуре. В последние годы большое значение в митохондриальном цитотоксическом каскаде при БП придается микроглиальной активации и воспалению [19], причем эти процессы не требуют индукции митохондриального апоптоза [20], что косвенно подтверждается и нашими данными.

ВЫВОДЫ

1. Нами представлены характеристики системы Вах/Вах/Vel при аутосомно-рецессивном паркинсонизме со сложной мутацией *PARK2*: установлено, что мутации *PARK2* приводят к сложной разбалансировке

систем программируемой клеточной гибели, ведущая роль в которой принадлежит, по-видимому, неапоптотическим молекулярным механизмам.

2. Полученные предварительные данные должны быть подтверждены на дофаминергических нейронах, полученных от других гомозиготных и гетерозиготных носителей мутаций гена *PARK2*.

3. Результаты нашей работы показывают, что разрабатываемые подходы к терапии нейродегенеративных заболеваний, связанные с подавлением апоптоза [11, 12], могут оказаться неэффективными при *PARK2*-ассоциированной БП. ●

Работа поддержана РФФ (грант № 14-15-01047).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jenner P., Morris H.R., Robbins T.W., Goedert M., Hardy J., Ben-Shlomo Y., Bolam P., Burn D., Hindle J.V., Brooks D. // *J. Parkinson's Dis.* 2013. V. 3. P. 1–11.
- Bonifati V. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20 (Suppl. 1). P. S23–S28.
- Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Лимборская С.А., Левин О.С., Милосердова О.В., Просокова Т.Н., Багыева Г.Х., Брис А. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2004. Т. 8. С. 66–72.
- Periquet M., Lücking C.B., Vaughan J.R., Bonifati V., Dürr A., De Michele G., Horstink M.W., Farrer M., Illarioshkin S.N., Polak P., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. P. 617–626.
- Kilariski L.L., Pearson J.P., Newsway V., Majounie E., Knipe M.D., Misbahuddin A., Chinnery P.F., Burn D.J., Clarke C.E., Marion M.H., et al. // *Mov. Disord.* 2012. V. 27. P. 1522–1529.
- Park J., Lee S.B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., Bae E., Kim J., Shong M., Kim J.M., Chung J. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 1157–1161.
- Matsuda N., Sato S., Shiba K., Okatsu K., Saisho K., Gautier C.A., Sou Y.S., Saiki S., Kawajiri S., Sato F., et al. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. P. 211–221.
- Lim K.L., Ng X.H., Grace L.G., Yao T.P. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V. 16. P. 935–949.
- Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А. и др. // *Нейрохимия.* 2013. V. 3. P. 233–241.
- Esposito E., Cuzzocrea S. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. P. 2764–2774.
- Lockshin R.A., Zakerib Z. // *J. Cell Mol. Med.* 2007. V. 11. P. 1214–1224.
- Kim J., Yang Y., Song S.S., Na J.H., Oh K.J., Jeong C., Yu Y.G., Shin Y.K. // *Biophys. J.* 2014. V. 107. P. 1601–1608.
- Berger A.K., Cortese G.P., Amodeo K.D., Weihofen A., Letai A., LaVoie M.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 4317–4328.
- Gama V., Swahari V., Schafer J., Kole A.J., Evans A., Huang Y., Cliffe A., Golitz B., Sciaky N., Pei X.H., et al. // *Sci. Signal.* 2014. V. 7(334). P. ra67. doi: 10.1126/scisignal.2005309.
- Kemeny S., Dery D., Loboda Y., Rovner M., Lev T., Zuri D., Finberg J.P., Larisch S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e38837.
- Fei Q., McCormack A.L., Di Monte D.A., Ethell D.W. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 3357–3364.
- Charan R.A., Johnson B.N., Zaganelli S., Nardozi J.D., LaVoie M.J. // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. P. e1313. doi:10.1038/cddis.2014.278.
- Yan J., Fu Q., Cheng L., Zhai M., Wu W., Huang L., Du G. // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 10. P. 2223–2233.
- Allam R., Lawlor K.E., Yu E.C., Mildenhall A.L., Moujalled D.M., Lewis R.S., Ke F., Mason K.D., White M.J., Stacey K.J., et al. // *EMBO Rep.* 2014. V. 15. P. 982–990.

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.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков (примерно 40 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 (20 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

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 (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись следует присылать в редакцию в электронном виде: текст в формате Word 2003 for Windows, рисунок в формате TIFF. Отдельным файлом присылается перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, списка литературы и подписей к рисункам.

При подаче статьи авторы заключают с редакцией договор о передаче права на использование произведения. Форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru. Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала *Acta Naturae*, или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 628.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, 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 коррек-

турой. 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 сноска, 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: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК·РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. 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 редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

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 первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.