

Письмо редакторов

Дорогие читатели!
Вашему вниманию представлен 26 номер журнала *Acta Naturae*.

Мы не отходим от традиционного расположения материала, публикуя ряд обзоров, экспериментальные статьи и материалы раздела «Форум». Последний написан коллективом авторов под руководством руководителя экспертной группы «Науки о жизни» ФЦПИР 2014–2020 Андрея Валериевича Лисицы. Материал посвящен направлениям развития комплекса, а следовательно, и вопросам целевого финансирования отдельных направлений науки. Авторами проведен анализ научных направлений, основанный на предложениях по формированию тематик исследований и проектов, поступивших в Минобрнауки России за 2013–2014 годы. Этот материал, несомненно, вызовет интерес у научной общественности. Авторами концепции определены четыре вектора развития: (1) персональная геномика и постгеном-технологии; (2) возможность интеграции устройств и материалов с организмом; (3) память и пластичность мозга; (4) биоактивные субстанции. По всей видимости, в последующем можно ожидать объявления соответствующих конкурсов по этим тематикам.

Обзоры данного номера посвящены весьма актуальным направлениям современной молекулярной биологии и биомедицины. Мы публикуем обзор коллектива авторов под руководством П.Г. Георгиева, посвященный оптимизации условий экспрессии рекомбинантных белков в эукариотических системах. Обзор имеет как фундаментальное, так и, безусловно, прикладное значение и весьма корреспондирует с материалом экспериментальной статьи Н.Б. Гасанова с соавт., посвященной оптимизации экспрессии генов белков в клетках китайского хомячка. Наш журнал сфокусирован во многом на вопросах молекулярной онкологии. Обзор группы М.П. Кирпичникова (проблемы создания ингибиторов PARP1) и экспериментальные работы групп С.М. Деева и О.Е. Андреевой посвящены проблемам взаимодействия лигандов с рецептором HER2/neu. В журнале затро-

нуты вопросы регенеративной медицины (обзор Е.С. Петровой) и врожденного иммунитета (статья группы Т.В. Овчинниковой). Не оставляем мы также без внимания и вопросы биохимии и энзимологии. В этом плане рекомендуется ознакомиться с классической работой в области формиадегидрогеназ группы В.И. Тишкова. В последние годы ряд авторов пристальное внимание уделяет внеклеточным нуклеиновым кислотам. Есть основания полагать, что они важны для диагностики онкологических заболеваний на ранних стадиях. Обзор группы П.П. Лактионова посвящен внеклеточным нуклеиновым кислотам в моче. В текущем номере публикуются статьи и по таким актуальным темам, как инфекция ВИЧ (работа группы С.Н. Кочеткова) и ноотропные препараты (работа группы С.Б. Середенина).

За 6 лет своего существования журнал приобрел определенную популярность у научной общественности. По данным Thomson Reuters, мы получили импакт-2014, равный единице. Это весьма неплохой показатель для российского журнала, имеющего лишь трехлетнюю историю открытого доступа для читателей в системе PubMed. Нам необходимо не терять завоеванные позиции. Мы предполагаем анонсировать прием кратких сообщений, включая медицинские наблюдения. При этом мы просим авторов максимально придирчиво относиться к уровню представляемых публикаций, сосредоточиться на важных аспектах доказательной медицины. Мы продолжим публиковать статьи и в области классической биохимии и молекулярной биологии. Редколлегия и редакционный совет приняли недавно решение осуществлять предварительный отбор статей из вновь поступивших. Таким образом, мы не можем гарантировать рецензирование абсолютно всех поступивших работ. Ряд из них будут отвергнуты на уровне предварительного рассмотрения редколлегией.

Мы ждем ваших работ и обещаем честное и непредвзятое их рецензирование. ●

*Редакционный совет,
Редакционная коллегия*

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*

Acta Naturae

ТОМ 7, № 3 (26), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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 (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
К. Нирхауз (Берлин, Германия),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швьядас (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 21 сентября 2015 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

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/list/

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.000

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

Ю. В. Мирошниченко, М. А. Простова,
А. В. Кветинская, А. В. Лилица

Концепция реализации приоритетного
направления «Науки о жизни» в период
2014–2020 годы 6

ОБЗОРЫ

О. Г. Максименко, Н. Б. Гасанов, П. Г. Георгиев
Регуляторные элементы в векторах
для эффективного получения клеточных
линий-продуцентов целевых белков 16

Н. В. Малюченко, Е. Ю. Котова, О. И. Кулаева,
М. П. Кирпичников, В. М. Студитский

Ингибиторы PARP1: разработка противоопу-
холевых препаратов 30

Е. С. Петрова

Восстановление поврежденного нерва
с помощью клеточной терапии (фундамен-
тальные аспекты) 42

| | |
|--|----|
| О. Е. Брызгунова, П. П. Лактионов Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике. | 54 |
|--|----|

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. А. Алексеева, И. С. Каргов, С. Ю. Клейменов, С. С. Савин, В. И. Тишков

| | |
|--|----|
| Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои <i>Glycine max</i> | 61 |
|--|----|

И. В. Богданов, Е. И. Финкина, С. В. Баландин, Д. Н. Мельникова, Е. А. Стукачева, Т. В. Овчинникова

| | |
|---|----|
| Структурно-функциональная характеристика рекомбинантных изоформ липид-транспортующего белка чечевицы | 72 |
|---|----|

Н. Б. Гасанов, С. В. Тощакон, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко

| | |
|--|----|
| Использование терминаторов транскрипции для создания трансгенных линий клеток яичников китайского хомячка (СНО) со стабильным и высоким уровнем экспрессии репортерного гена. | 82 |
|--|----|

П. Н. Григорьев, А. Л. Зефиоров

| | |
|---|----|
| В синхронной и асинхронной секреции медиатора принимают участие одни и те же синаптические везикулы. | 90 |
|---|----|

О. А. Макеева, А. А. Слепцов, Е. В. Кулиш, О. Л. Барбараш, А. М. Мазур, Е. Б. Прохорчук, Н. Н. Чеканов, В. А. Степанов, В. П. Пузырев

| | |
|---|----|
| Геномное исследование коморбидности сердечно-сосудистого континуума. | 99 |
|---|----|

Н. А. Никитенко, Т. Speiseder, E. Lam, П. М. Рубцов, Х. Д. Тонаева, С. А. Борзенко, Т. Dobner, В. С. Прасолов

| | |
|---|-----|
| Регуляция репликации аденовирусов человека с помощью РНК-интерференции | 111 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева, О. А. Деева, С. А. Ярков, М. А. Яркова, С. Б. Серединин Дипептидный лиганд транслокаторного белка ГД-23 проявляет анксиолитическую и ноотропную активности | 120 |
|---|-----|

Е. С. Матюгина, М. С. Новиков, Д. А. Бабков, В. Т. Валуев-Элистон, К. Ванпуль, С. Зикари, А. Корона, Е. Трамонтано, Л. Марголис, А. Л. Хандажинская, С. Н. Кочетков

| | |
|--|-----|
| Производные 5-ариламиноурацила как потенциальные фармакологические агенты двойного действия | 126 |
|--|-----|

Ю. В. Сидорова, Н. Г. Чернова, Н. В. Рыжикова, С. Ю. Смирнова, М. Н. Сеницына, Ю. Е. Виноградова, У. Л. Джулакян, А. М. Ковригина, Е. Е. Звонков, А. Б. Судариков

| | |
|---|-----|
| Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме | 130 |
|---|-----|

О. Н. Шилова, Г. М. Прошкина, Е. Н. Лебедеенко, С. М. Деев

| | |
|---|-----|
| Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека | 141 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| А. М. Щербаков, О. Е. Андреева Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы: роль ERα и HER2/неу. | 149 |
|---|-----|

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Правила для авторов | 156 |
|--------------------------------------|-----|



РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Концепция реализации приоритетного направления «Науки о жизни». (См. статью Мирошниченко и др.)

Концепция реализации приоритетного направления «Науки о жизни» в период 2014–2020 годы

Ю. В. Мирошниченко^{1*}, М. А. Простова², А. В. Кветинская³, А. В. Лисица¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8

²Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, 142782, Москва, поселение Московский, 27-й км Киевского шоссе, поселок Института полиомиелита

³Некоммерческое партнерство «Технологическая платформа «Медицина будущего», 634055, Томск, Академический просп., 8/8

*E-mail: yuliana.miroshnichenko@gmail.com

«Науки о жизни» – одно из приоритетных направлений развития научно-технологического комплекса России. Научные интересы работающих в этой области российских коллективов охватывают широкий спектр проблем, начиная с конструирования приборов и заканчивая сложнейшими молекулярно-биологическими экспериментами. Основываясь на предложениях по формированию тематик исследований и проектов, поступивших в Минобрнауки России за 2013–2014 годы, сформулирована Концепция реализации приоритетного направления «Науки о жизни». В Концепции определены четыре вектора развития: (1) персональная геномика и постгеномные технологии; (2) возможность интеграции устройств и материалов с организмом; (3) память и пластичность мозга; (4) биоактивные субстанции.

В соответствии с поручением Президента Российской Федерации с начала 2014 года из средств федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (далее – Программа) финансируются прикладные научные исследования (<http://www.kremlin.ru/assignments/20065>). Программа поддерживает проекты, ориентированные на достижение четких количественных и качественных характеристик разрабатываемой продукции, наличие конкретного потребителя этой продукции и бизнес-партнера, готового профинансировать разработку и реализовывать продукт в дальнейшем [1].

Экспертной группой по приоритетному направлению «Науки о жизни» (далее – Экспертная группа) в сотрудничестве с Минобрнауки России, Дирекцией научно-технических программ, технологическими платформами «Медицина будущего» и «БиоТех2030» установлены перспективные для Российской Федерации направления исследований. Направления объединены в «Концепцию реализации экспертной группой приоритетного направления “Науки о жизни” в период 2014–2020 годы» (далее – Концепция).

Концепция создана на основе анализа поступающих в Минобрнауки России предложений по формированию тематик исследований и проектов (далее – Предложение) с учетом

современных мировых научных трендов. Экспертная группа выявила эффективные научные коллективы, способные работать на мировом уровне и получать прикладные результаты в кооперации с бизнес-партнером. Такой научный коллектив должен иметь значительную публикационную историю как подтверждение опыта и задела и обладать компетенцией для подготовки отчетной эскизной конструкторской и технической документации в соответствии с требованиями «Единой системы технологической документации». В противном случае результат проекта окажется несостоятельным для дальнейшего практического использования, что приведет к неэффективному расходованию бюджетных средств.

В представленной статье обозначены основные направления Концепции и обобщающие примеры, встретившиеся в ходе деятельности Экспертной группы.

МЕХАНИЗМЫ АНАЛИЗА ПРЕДЛОЖЕНИЙ ЭКСПЕРТНОЙ ГРУППОЙ

Экспертная группа сформирована из ученых, инженеров и технологов, для которых в качестве входного параметра учитывались не только наукометрические показатели, но и готовность к оперативному принятию решений и постоянному участию в работе группы, продиктованная большим количеством поступающих на рассмотрение в 2014 году Предложений (до 50 в месяц). Например, время обработки информации известным ученым, индекс Хирша которого превышает 40, превосходило отведенное регламентом Программы допустимое время. Прослеживалась следующая тенденция – чем выше индекс Хирша у эксперта, тем менее активен человек при проведении аналитической оценки работ вне сферы своей узкой компетенции. В сфере же компетенции, в подавляющем большинстве, единственным результатом работы была критика потенциальных конкурентов. Также в Экспертную группу вошли представители технологических платформ, бизнес-сообщества, вузовской науки и представители государственного заказчика Программы.

Одно из основных направлений деятельности Экспертной группы – отбор и подготовка обоснований и объемов финансирования тематик для будущих конкурсных лотов на проведение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (далее – Лот). Подготовка проектов Лотов осуществляется на основании рассмотрения Предложений, зарегистрированных

в информационной системе Программы (<http://tematika.fcspir.ru>). При размещении Предложения инициатор должен внести в предлагаемую форму основные сведения о проекте, в том числе обоснованность актуальности его реализации и необходимости финансирования за счет средств из федерального бюджета; указать публикации, отражающие мировой уровень планируемой разработки и характеризующие научно-технический задел коллектива в данной области исследований.

Формирование проектов Лотов требует от членов Экспертной группы оценки возможных рисков, связанных с последующим выполнением/невыполнением работ за счет средств федерального бюджета. Поэтому параллельно использовался альтернативный механизм. Предложения, признанные наиболее перспективными по результатам проведенной в информационной системе экспертизы, размещали в виде сформулированной тематики (название и цель проекта) на веб-площадке Экспертной группы (<http://rgls.wikivote.ru/>), используемой в качестве инструмента для обсуждения экспертных мнений. Здесь Предложения сопровождались краткой характеристикой планируемых работ, публикациями, подтверждающими научно-технический задел и уровень исследований, ссылками на пояснительную записку и проект технического задания.

Обоснованность и реализуемость тематики доказывалась публикациями последних 5 лет в журналах с импакт-фактором не менее 0.8. Исключались Предложения, которые не поддерживались близкими по тематике публикациями российских коллективов, поскольку такая ситуация указывала на отсутствие в Российской Федерации

компетенций, необходимых для реализации проекта. Также исключались Предложения, в техническом задании которых не содержалось численных показателей достижения результата, а в пояснительной записке отсутствовала таблица сравнения с экспериментальными (опубликованными – статья или патент) и/или промышленными аналогами по количественным характеристикам экспериментальных и/или промышленных аналогов (или было указано, что аналогов нет).

Из проанализированных Экспертной группой Предложений, поступивших в рамках мероприятий 1.2 и 1.3 Программы¹, около 20% были отклонены по причине отсутствия ссылок на свои публикации, подтверждающие научно-технический задел по предлагаемой к исследованию тематике. При этом поиск в текстовых базах данных медицинских и биологических публикаций также не позволял выявить опыт работы коллектива инициаторов в области наук о жизни.

Другие Предложения отклонялись из-за отсутствия информации, необходимой для проведения объективной экспертной оценки. Несмотря на соблюдение формальных требований к оформлению, последовательное изложение и наличие на первый взгляд незаурядных идей, их связь с экспериментальной работой и реальность осуществления проекта вызвали сомнение. Можно предположить, что Предложения названной категории подготавливались лицами, не имеющими отношения к исследованию. При этом объемы заявленного финансирования многих Предложений, в том

¹ Мероприятие 1.2 – проведение прикладных научных исследований для развития отраслей экономики. Мероприятие 1.3 – проведение прикладных научных исследований и разработок, направленных на создание продукции и технологий.

числе и удовлетворяющих основным требованиям, зачастую превышали фактические возможности Программы в 8.5 раза. В связи с этим были разработаны принципы отбора Предложений, вошедшие в состав главного документа, которым руководствуется в своей деятельности Экспертная группа, – Концепции.

Согласно этим принципам Перспективные тематики выносились на обсуждение Экспертной группы, а их инициаторы выступали с докладом для обоснования ключевых позиций заявленной тематики. Основными критериями принятия решений были: 1) актуальность разработки и соответствие современным мировым научным трендам; 2) результат, потенциально применимый в реальном секторе экономики; 3) наличие заинтересованного в результате бизнес-партнера; 4) наличие в России научных коллективов, работающих по теме проекта; 5) поддержка профильной технологической платформы.

Предложения проходили через систему голосования среди экспертов группы и получали балльную оценку. Из вынесенных на заседания Предложений 72% получили проходной балл, при этом во всех случаях при формировании проектов Лотов было рекомендовано изменить исходную формулировку темы и цели, а также состав технического задания. Последнее обусловлено требованием Минобрнауки России к конкуренции научных коллективов за исполнение работы. Другими словами, Экспертная группа формировала проекты Лотов таким образом, что они допускали достаточно широкую трактовку требований, необходимых для достижения результата. Такой подход позволил обеспечить участие множества коллективов в проводимых Минобрнауки России конкурсах и тем самым

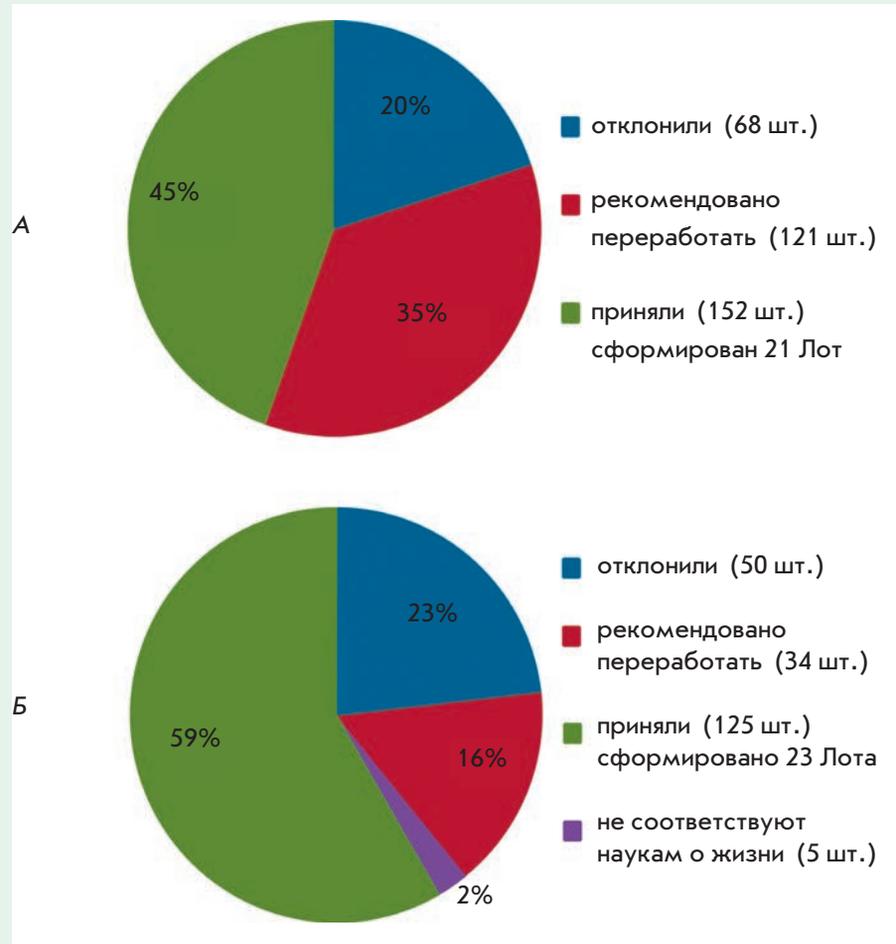


Рис. 1. Распределение Предложений, поступивших по мероприятию 1.2 (А) и по мероприятию 1.3 (Б)

расширить возможный круг участников со стороны научной общественности для выбора наиболее конкурентоспособных исполнителей. Заметим, что отбор исполнителей осуществляется без участия Экспертной группы.

В целом, в период с ноября 2013 до конца 2014 года было проанализировано 341 Предложение по мероприятию 1.2 и 214 Предложений по мероприятию 1.3. На основании 152 Предложений (45% от общего количества) сформировали 21 Лот по мероприятию 1.2, а на основании 125 Предложений (59% от общего количества) – 23 Лота по мероприятию 1.3. Распределение поступивших Предложений представлено на рис. 1.

РОЛЬ КОНЦЕПЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

На основании спектра поступивших в Экспертную группу Предложений сформулированы стратегические направления, которые легли в основу Концепции (рис. 2). Выбранные направления признаны актуальными для Программы по следующим причинам:

- 1) по тематикам каждого направления имеются свежие публикации в рецензируемых журналах;
- 2) в России существуют сильные, динамично развивающиеся научные коллективы в соответствующих областях, квалифика-

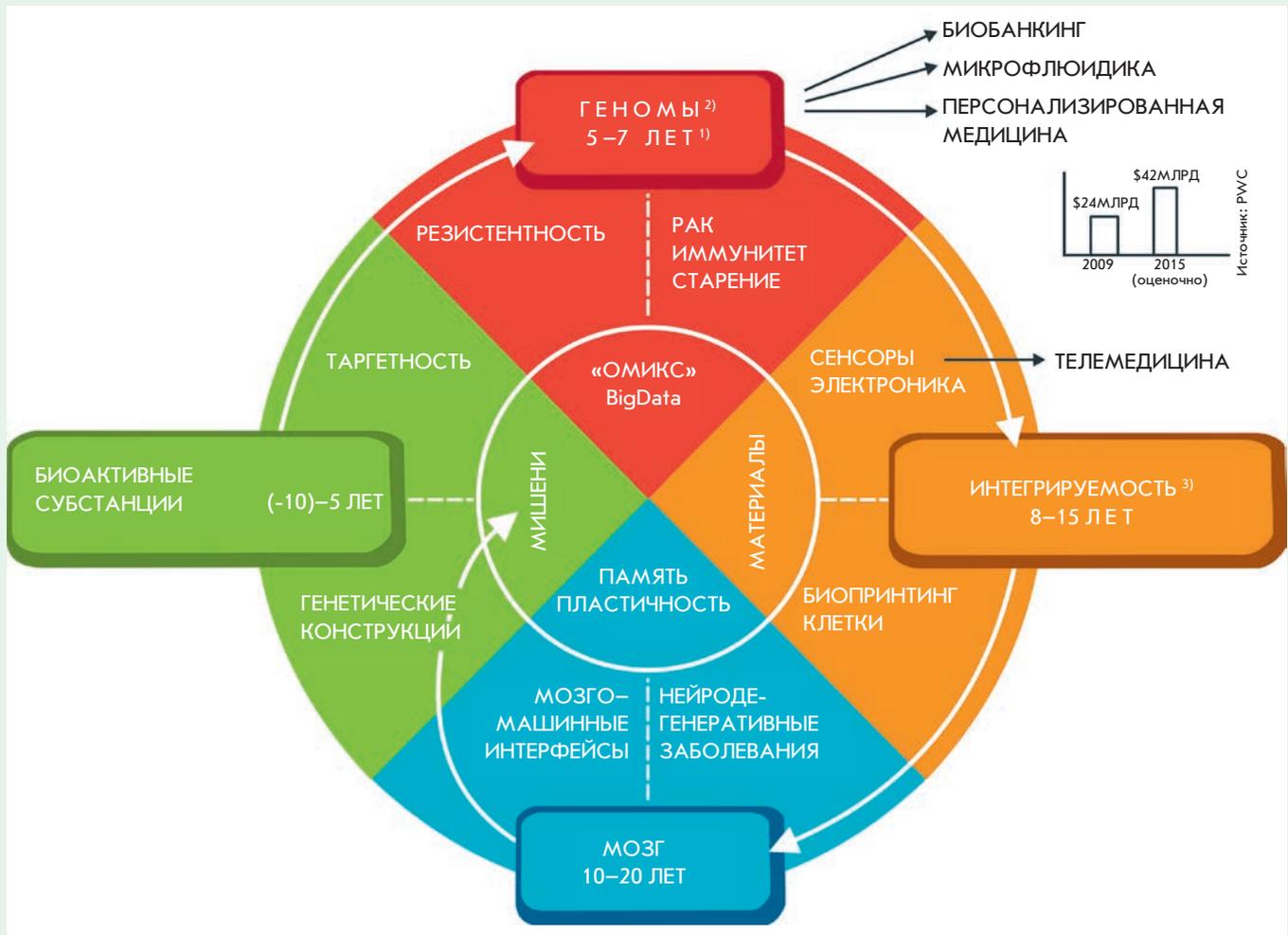


Рис. 2. Концепция реализации приоритетного направления «Науки о жизни» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы». (1) Отмечены периоды достижения ожидаемого экономического эффекта. (2) Персональная геномика и постгеномные технологии. (3) Имплантируемые устройства и материалы. Полный текст Концепции размещен на сайте <http://rgls.ru/> в разделе «Концепция». Обсуждение проектов в рамках Концепции приводится на сайте <http://rgls.wikivote.ru/>

ция которых подтверждена публикациями;

3) результатом реализации проектов по данным направлениям должен стать набор конкретных продуктов для реального сектора экономики¹.

Поступившие Предложения можно разделить на две катего-

¹ Реальный сектор экономики – совокупность отраслей экономики, производящих материальные и нематериальные товары и услуги за исключением финансово-кредитных и биржевых операций.

рии – медицинская наука и науки о жизни. Это искусственное разделение, однако оно оказалось необходимым, так как Экспертная группа не должна реализовывать задачи, находящиеся в сфере компетенции Минздрава России. Поэтому разработка медицинских технологий, изделий медицинского назначения и фармпрепаратов не включена в Концепцию. Данное разграничение также обосновывается специализацией членов Экспертной группы. Включение

в состав Экспертной группы ученых с высоким индексом Хирша естественным путем привело к смещению акцента в сторону молекулярной и клеточной биологии.

Приведенная на рис. 2 диаграмма обозначает четыре сектора, соответствующих стратегическим направлениям Концепции: «Геномы», «Интегрируемость», «Мозг» и «Биоактивные субстанции». Первое стратегическое направление Концепции – «Геномы» – посвящено постгеномным

технологиям. Это масштабные исследования геномов/транскриптомов/протеомов, позволяющие предложить стратегии выбора индивидуальной диагностики и/или терапии. Сектор характеризуется такими приоритетными проблемами, как резистентность опухолей и инфекций к лечению, канцерогенез, нарушения иммунной системы, старение. Важно подчеркнуть, что расстановка приоритетов в секторе не имеет отношения к социальной значимости заболеваний, а является указанием на модели, в рамках которых постгеномные исследования должны проявить свою эффективность.

Проиллюстрируем логику применения приоритетов сектора «Геномы» на примере канцерогенеза. Проект, целью которого заявлено снижение заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний или выбор индивидуальной химиотерапии, не будет соответствовать Концепции. Качество выполнения таких клинических задач должно контролироваться со стороны соответствующего органа исполнительной власти, т.е. со стороны Минздрава России. С другой стороны, проект, целью которого является расшифровка геномов опухолей и выявление мутаций, специфичных для российской популяции, целиком соответствует Концепции. В этом случае результатом проекта станет верифицированная база данных специфических мутаций, т.е. инструмент для решения ранее указанных клинических задач по борьбе с канцерогенезом. Качество результата, в свою очередь, будет оценивать бизнес-партнер, заинтересованный в переходе от прикладного научного исследования к фазе создания коммерческого продукта. Поскольку база данных онкогеномов может быть использована для решения разноплановых за-

дач, именно в этом случае будет реализован принцип междисциплинарного развития научно-технологического комплекса, соответствующий мировым тенденциям развития медицинской науки [2].

Подчеркнем, что Программа открыта и для клинических работ: для этого предусмотрен директивный путь формирования конкурсного задания, когда приглашение об использовании работ с Минобрнауки России включает другой заинтересованный орган исполнительной власти (в науках о жизни это, прежде всего, Минздрав России и Минсельхоз России). Конкурс объявляется по конкретной, сформулированной федеральным органом исполнительной власти, тематике. В силу существования директивного пути формирования таких Лотов, из Концепции исключены многие научные направления. Например, приборы для диагностики и лечения, медицинские технологии, клинические, доклинические и эпидемиологические исследования, программно-технические комплексы для медицины и здравоохранения. Также в Концепцию не вошли: аналитическое приборостроение, биоразнообразие и биоремедиация, мониторинг и охрана окружающей среды, функциональные продукты питания и ГМО. Работы данных направлений инициируются соответствующими органами исполнительной власти, но не Экспертной группой.

Сектор «Геномы» (рис. 2) хорошо иллюстрирует и принципы практической реализации Концепции. Например, проект по биобанкингу не может стать предметом конкурса, поскольку это масштабная инфраструктурная задача. В то же время любой грамотно построенный проект по исследованию биологического материала с использованием геномных и постгеномных техно-

логий будет способствовать стандартизации протоколов забора, транспортировки и хранения материалов. Аналогично, необходимость автоматизации и унификации стадий подготовки проб будет способствовать созданию микрофлюидных устройств. Наконец, потребление результатов прикладных научных исследований в секторе «Геномы» ожидается в области персонализированной медицины. По прогнозам Price Waterhouse Coopers рынок персонализированной медицины к 2016 году достигнет 42 млрд долларов США.

Для понимания структуры Концепции важно осознать, как развивается современный сектор биотехнологии в мире. Биотехнологическая компания не имеет доступа к рынку медицинских услуг или изделий медицинского назначения, поскольку этот сектор закреплен за крупными корпорациями. Конкурировать с корпорациями уровня Pfizer, AstraZeneca, Bayer и т.п. невозможно, поскольку бюджет всего приоритетного направления «Науки о жизни» составляет менее 1% от затрат на исследования и разработки фарминдустрии. Но такая конкуренция и не нужна, так как рост биотехнологического сектора в области биофармацевтики и биомедицины в XXI веке достигается не за счет создания продукции, нужной врачам или пациентам, а за счет развития и совершенствования технологий. Расшифровка генома человека привела к появлению 310000 новых рабочих мест, и при инвестициях в 3.8 млрд долларов сформировала в 10 раз больший по объему рынок [3]. При этом геном, с точки зрения медицины, оказался востребованным в довольно ограниченном масштабе. Сегодня технологии расшифровки генома в большей степени интересуют ИТ-компании, чем

терапевтов или хирургов: например, Google начал проект Baseline Study [4].

Что же является продукцией Программы по приоритетному направлению «Науки о жизни»? Было бы спекуляцией утверждать, что это здоровье людей или лечение пациентов. От реального результата до его клинического приложения, которое можно оценить количественно, проходят десятки лет. Это не соответствует ни временным, ни финансовым рамкам Программы. Любые Предложения такого рода автоматически квалифицируются как не соответствующие формату Программы и отклоняются.

В то же время Предложения поискового характера также не соответствуют формату Программы, которая предусматривает получение прикладного результата. Таким промежуточным результатом может быть что-то полезное для научных исследований. По сути, продукт представляет собой «набор пробирок» и инструкцию как этот набор использовать, чтобы провести определенное научное исследование. Как ни странно, высокие темпы роста рынка обеспечены именно наборами реактивов, а не «тест-системами для ранней диагностики рака» или «лекарствами для лечения сердечно-сосудистой системы». Например, компания Luminex обеспечивает динамику роста капитала 30–40% (это означает, что если Вы купили в 2014 году акции этой компании на 100 тыс. рублей, то в 2015 году Вы их продадите за 130–140 тыс. рублей). Обращаясь к финансовому отчету Luminex за 2013 год (<http://investor.luminexcorp.com>), видим, что основной рост – 72% – обеспечивают заказы наборов реагентов, тогда как собственно на продажи планшетных ридеров и сектор медицинских услуг при-

ходит около 10 и 5% соответственно. Причем инновационные медицинские услуги оказываются в формате CLIA (www.cdc.gov.clia) – системы регистрации услуг в области здравоохранения, аналогов которой в России пока нет.

В основе узкого окна возможностей, доступного для России в области геномных и постгеномных технологий, находятся увязанные понятия «большие данные» и «омикс-науки» (рис. 2). Понятия основаны на парадигме обработки чужой информации, а не на генерировании оригинальных результатов. Принципиально важный вклад в развитие методов процессирования постгеномных данных внесла компания «Яндекс» [5], обеспечив долгосрочную «плавучесть» российских разработок в области биоинформатики.

Второе стратегическое направление Концепции – «Интегрируемость» (рис. 2). Этот сектор отражает тенденцию имплантировать в организм человека искусственно созданные конструкции. В этом секторе собраны клеточные технологии, микроэлектроника, микро- и наномеханические устройства (МЭМС и НЭМС). Примером разработки, которая была бы уместна в данном секторе 3–4 года назад, является микроустройство, преобразующее энергию движений сердца в электрическую [6]. В настоящее время отставание вектора биоМЭМС не критично для российской науки, поэтому Экспертная группа в рамках Концепции рассматривает проекты этого направления.

Репрограммируемые клетки интересны в составе проектов по выращиванию органов, причем этот процесс должен осуществляться на биорезорбируемых матрицах, формируемых с помощью биопринтинга [7]. В рамках данной задачи Экспертная группа отказалась от стволовых клеток и соз-

дания протезов для ортопедии и челюстно-лицевой хирургии. Подобные проекты существенно финансировались Программой 2009–2013 годов, до сих пор финансируются в рамках федеральной целевой программы «ФАРМА 2020», поэтому исключены из Концепции.

Как и в секторе «Геномы», в секторе «Интегрируемость» обозначена базовая технология, где Россия может конкурировать, – материалы. Востребованность этого направления зависит от того, смогут ли ученые, работающие над созданием новых материалов, перестроиться в новый формат, в котором клиническая проблема, решаемая за счет создания высокотехнологичного устройства, предъявляет требования к свойствам новых материалов. Ни в коем случае не наоборот, когда возможности создания новых материалов «подстраивают» под себя медицинские задачи. Изложенный подход правомочен не только в материаловедении. Концепция обозначает, что не достижения в области химии и физики должны определять науки о жизни, а наоборот, науки о жизни должны ставить задачу для нанотехнологии, лазерной физики, физики высоких энергий, а также для прикладных дисциплин – электроники, схемотехники. Для специалистов-небиологов (например, материаловедов) такой поход является сменой парадигмы, ведь по сути они не могут быть лидерами проектов в науках о жизни, а должны ограничить себя ролью соисполнителей.

Третье стратегическое направление Концепции – «Мозг» – сформировано под влиянием крупнейших проектов современности – американского проекта «Коннектом» [8] и европейского «Мозг» [9]. Горизонт реализации названного ключевого направления составляет 20–30 лет,

т.е. основные специалисты, которые есть в стране, ко времени реализации достигнут пенсионного возраста (2040-й год).

Инвестиции в это научное направление в Америке, Европе и Японии превышают затраты России более чем на 2 порядка. В Российской Федерации имеется опыт инвестирования в области лекарственной терапии нейродегенеративных заболеваний, исчерпывающийся двумя продуктами – Димебоном (отозван со стадии клинических испытаний компанией Pfizer [10]) и Семаксом, который серьезные фармкомпании не заинтересовали, хотя первая публикация датируется 2000 годом [11].

В процессе работы над Концепцией в основу стратегического направления «Мозг» положены понятия память и пластичность. Исследование свойств мозга позволит если не наверстать, то хотя бы не увеличить отставание от международного уровня. Направление вошло в состав приоритетных научных задач, поставленных Минобрнауки России перед сообществом исследователей [12]. Лоты сектора «Мозг» ориентированы на создание инструментов исследования и управления работой живого мозга. На данный момент в России существует исследовательская группа, освоившая и реализующая оптогенетические методы на свободноподвижных животных [13]. Следующим шагом является разработка инструментов одновременной подачи и снятия сигнала при исследовании механизмов формирования памяти и других когнитивных процессов в живом мозге. Отклики головного мозга, регистрируемые при разных типах деятельности свободноподвижного организма, составят пласт больших данных, нуждающийся в суперкомпьютерах с новой архитектурой [14]. Сегодняш-

ние рынки уже сформированы в области нейроинтерфейсов глаз-мозг-компьютер для игровых приставок и для управления «умным домом» [15, 16]. Считывание активности мозга будет также иметь решающее значение при оценке качества подачи рекламного аудио- и видеоматериала (нейромаркетинг), при подготовке и координации групп быстрого реагирования, ускоренном обучении иностранным языкам [16].

Четвертое стратегическое направление Концепции – «Биоактивные субстанции». В России существует ряд профессиональных компаний, стремящихся на рынок биотехнологий и имеющих для этого необходимые возможности, среди них: ЗАО «Биокад», ЗАО «Р-Фарм», ЗАО «Генериум», ФГУП «НПО «Микроген», ООО «ФармЭко». В рамках Программы в интересах биотехнологических компаний могут быть предложены только разработки, имеющие в основе механизмы молекулярного взаимодействия белков, антител и пептидов с живой клеткой. Безадресная доставка лекарств, создание липосомальных форм, разработка систем пролонгированного действия на основе биополимеров, генотерапия, исследование действий малых молекул, скрининг комбинаторных библиотек – области, в которых патентная активность чрезвычайно высока, из чего следует, что разработки в перечисленных выше областях должны либо реализовываться в рамках федеральной целевой программы «ФАРМА 2020», либо вообще должны быть исключены из приоритетов научно-технологического развития страны.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СПРОСА НА ПРИКЛАДНОЙ РЕЗУЛЬТАТ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИЗНИ

«Науки о жизни» – многогранное приоритетное направление, ко-

торое можно охарактеризовать как «бесконечно малую точку» между государственными заданиями научных учреждений ФАНО, Минздрава и Минсельхоза России, а также между курируемой Минпромторгом России федеральной целевой программой «ФАРМА 2020», программой «Фундаментальные исследования для медицины» Российской академии наук и грантами РФФИ по направлениям медицина и биология. Трансформировать эту «малую точку» в поле для развития научно-технологического потенциала страны удастся в том случае, если в Программе принимают участие коллективы, подтверждающие свою квалификацию рейтинговыми публикациями. В биомедицинских науках публикация хорошо цитируемых статей в журналах с высоким импакт-фактором является базовым навыком [17].

Проанализированные Экспертной группой Предложения в определенной степени отражают современное состояние российской научной общественности – наличие идей академического масштаба, но недостаточность навыков структуризации, планирования и достижения заданного результата. Необходимо подчеркнуть, что Экспертная группа рассматривает публикации не как оценку научной состоятельности идеи проекта, а как доказательство, что инициатор проекта сумеет не только начать исследование, но и довести его до конца.

Структура формирования тематик проектов в рамках Программы представляет собой краудсорсинг, совмещенный с экспертной оценкой результатов. Формулирование ранее описанных стратегических направлений Концепции зависело от количества Предложений, поступивших от научного сообщества и технологических платформ. Эксперт не мог внести в Концепцию идею, если

для нее не было трех-четырех Предложений в информационной системе. Из большинства поступивших и далее заслушанных на заседании Экспертной группы Предложений не сформированы тематики из-за невозможности конструктивно анализировать полученный материал.

Результатом прикладных научных исследований по приоритетным направлениям Программы должны быть конкретные продукты, способные конкурировать с мировыми аналогами. Это требует от научного сообщества эффективного взаимодействия с конструкторами и инженерами, чтобы перейти от формата поисковой науки к формату прикладной. Включение в работу технологических платформ с внутренней системой проработки тематик способствует формированию связей ученый + инженер + бизнес-партнер = прикладной результат.

Получение прикладного результата экономически обосновано при наличии заинтересованного бизнес-партнера, выражающего готовность этот результат использовать. Кто же бизнес-партнер? В Программе готовы участвовать в основном компании, являющиеся потребителями полученного результата, например, ЗАО «Евроген», ЗАО «Синтол», ООО «НПО ДНК-технология». Годовой оборот бизнес-партнеров проектов Программы составляет от десятков до нескольких сотен миллионов рублей. Пока речь не идет о крупных индустриальных партнерах, вертикальных холдингах и вкладе в развитие целых индустрий. В науках о жизни рынок ближайших 10–20 лет будет нишевым, и успех на этом рынке будет зависеть от возможностей освоения технологий интеллектуального производства.

Предугадать образование новых рыночных ниш можно путем анализа мировых баз данных, та-

ких, как база научных публикаций Web of Science (WoS) и патентная база Orbit [18]. Анализ ключевых слов (поискового образа) позволяет выявить динамику публикационной и цитатной активности, т.е. понять, растет или снижается заинтересованность мирового научного сообщества в заданной тематике. Динамика подачи патентных заявок и выдачи патентов показывает, сформировались ли технологические подходы в данной области. Кроме того, анализ позволяет оценить потенциал тематики для выхода в реальный сектор экономики путем сравнения количества патентов, принадлежащих университетам и компаниям.

Проблемой принятия автоматизированного форсайта является зависимость результата от способа формулировки так называемого поискового образа – комплекса ключевых слов и словосочетаний, связанных друг с другом логическими операторами. Результаты анализа одинаково неинформативны как при широко, так и при слишком узко заданном поиске. Здесь эффективным оказалось сотрудничество со специалистами в исследуемой тематике, предлагающими варианты коррекции поискового образа, как в примере на рис. 3. В исходном варианте проект набрал 20 из 100 возможных баллов. После корректировки поискового образа рейтинг составил 55 из 100.

Опираясь на результаты анализа тематик, сформированной Экспертной группой, можно сделать вывод, что лекарства, диагностикумы, другие изделия медицинского и сельскохозяйственного назначения не могут быть приоритетом Программы. Программа в рамках направления «Науки о жизни» предоставляет уникальную возможность разработать что-то необходимое самому разработчику для дальнейшего развития. Тогда появляется шанс,

что разработка будет востребована не только разработчиком, но и другими группам, работающими по всему миру. Если после завершения проекта практическая реализация его результатов не предусмотрена, то это фундаментальный формат, не подпадающий под текущие требования Программы.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОНЦЕПЦИИ

Сравнивая Концепцию с обзором технологического развития, опубликованным Массачусетским технологическим институтом [19], можно наблюдать совпадения стратегических направлений Концепции с ключевыми трендами: моделирование головного мозга, предиктивная медицина, биопринтинг, BigData, телемедицина и мобильное здравоохранение. Это указывает на то, что в стране есть ученые, способные улавливать перспективные тенденции. В то же время активно и успешно работающий в определенной области специалист хотя и «улавливает» прорывное направление, но не допускает возможности реализации прорыва без своего личного участия и контроля.

В науках о жизни ситуация самопостановки задачи (уместная для РФФИ и РНФ, но неприемлемая для целевого метода реализации Программы) может быть решена за счет механизма многовариантных «зонтичных» Лотов, предложенного Минобрнауки России. Такие Лоты рассчитаны на несколько победителей (исполнителей). Тематику Лота, конкурс по которому отсутствует, следует считать несостоятельной. Например, если по Лоту подана одна заявка на место, то вполне вероятно, что такой конкурс создан искусственно, без учета возможности дальнейшего развития планируемой разработки. К сожалению, такие примеры уже по-

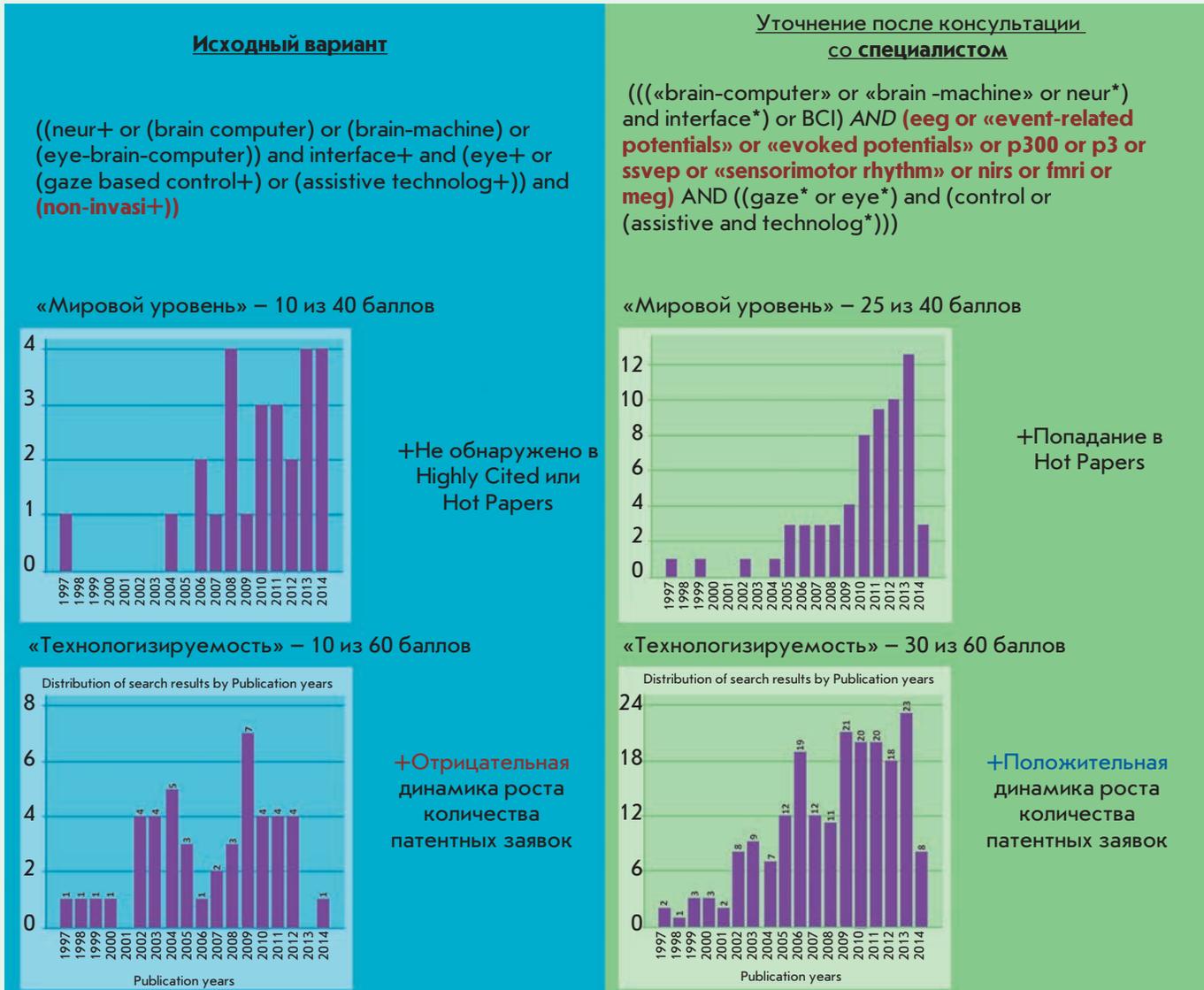


Рис. 3. Влияние формулировки поискового образа (ключевых слов) на результаты анализа баз данных Web of Science (мировой уровень) и Orbit (технологизируемость)

явились в 2014 году, в частности, конкурсы, направленные на исследование единичных клеток (single-cell-omics), на создание неинвазивных нейростимуляторов, на расшифровку геномов животных.

В информационную систему Программы продолжают поступать Предложения, которые анализируются экспертами группы. На основании вновь поступающих Предложений и постоянно меня-

ющейся картины развития современной науки будет меняться и Концепция. Опираясь на аналитические способности некоторых ученых предвидеть далеко вперед, возможно формировать тематики общего содержания, так как они становятся ориентирами для подачи последующих Предложений, в рамках этих тематик поддерживать не только (и даже не столько) коллективы-лидеры со сложившейся репутацией,

но и коллективы второго уровня, готовые развивать направление. Отбор среди последних производится по качеству подготовки Предложений. Подготовка квалифицированных специалистов второго уровня требует стабилизирующих усилий от государственного заказчика, так как условия формирования тематик исследований и проектов должны сохраняться неизменными на протяжении нескольких лет. ●

Авторы благодарят
Н.Г. Куракову, заведующую
отделением научно-
технологического
прогнозирования в области

биомедицины ФГБУ «ЦНИИОИЗ»
Минздрава России, за помощь
при работе с базой научных
публикаций Web of Science
(WoS) и патентной базой Orbit;

В.В. Бурова, председателя совета
директоров компании WikiVote!,
за предоставление электронной
площадки для деятельности
Экспертной группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шаталова Н. Плюсы нового формата. Изменения в ФЦП пошли ей на пользу // Ежедневная газета научного сообщества «Поиск». 2014. № 29–30.
2. Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 № 2580-р «Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года».
3. Hood L.E., Omenn G.S., Moritz R.L., Aebersold R., Yamamoto K.R., Amos M., Hunter-Cevera J., Locascio L. // *Proteomics*. 2012. V. 18. № 12. P. 2773–2783.
4. Есакова П. Google запустил проект по изучению генетики человека // Информационное агентство РБК. 25.07.2014. URL: <http://top.rbc.ru/society/25/07/2014/938993.shtml> (дата обращения: 26.07.2014).
5. Школа анализа данных «Яндекс». URL: <https://yandexdataschool.ru/> (дата обращения: 26.07.2014).
6. Dagdeviren C., Yang B.D., Su Y., Tran P.L., Joe P., Anderson E., Xia J., Doraiswamy V., Dehdashti B., Feng X., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 5. № 111. P. 1927–1932.
7. Bertassoni L.E., Cecconi M., Manoharan V., Nikkhah M., Hjortnaes J., Cristino A.L., Barabaschi G., Demarchi D., Dokmeci M.R., Yang Y., et al. // *Lab on a Chip*. 2014. V. 13. № 14. P. 2202–2211.
8. Human Connectome Project. URL: www.humanconnectomeproject.org/ (дата обращения: 26.07.2014).
9. Human Brain Project. URL: <https://www.humanbrainproject.eu/> (дата обращения: 26.07.2014).
10. Medivation and Pfizer Announce Results from Phase 3 Concert Trial of Dimebon in Alzheimer's Disease. // Пресс-релиз Pfizer от 16.01.2012. URL: http://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/medivation_and_pfizer_announce_results_from_phase_3_concert_trial_of_dimebon_in_alzheimer_s_disease (дата обращения: 18.06.2015).
11. Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Glazova N.Yu., Voskresenskaya O.G., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F. // *Dokl. Biological Sciences*. 2000. V. 372. P. 243–246.
12. Перечень приоритетных научных задач, решение которых требует использования возможностей федеральных центров коллективного пользования научным оборудованием. URL: <http://government.ru/orders/10326> (дата обращения: 26.07.2014).
13. Doronina-Amitonova L.V., Fedotov I.V., Ivashkina O.I., Zots M.A., Fedotov A.V., Anokhin K.V., Zheltikov A.M. // *Sci. Repts*. 2013. № 3. P. 3265.
14. Горбунов В., Елизаров С., Корнеев В., Лацис А. // *Суперкомпьютеры*. 2014. Т. 17. № 1. С. 24–28.
15. Marsman J.B., Renken R., Velichkovsky B.M., Hooymans J.M., Cornelissen F.W. // *Human Brain Mapping*. 2012. V. 33. № 2. P. 307–318.
16. Mokienko O.A., Chervyakov A.V., Kulikova S.N., Bobrov P.D., Chernikova L.A., Frolov A.A., Piradov M.A. // *Front. Comp. Neurosci*. 2013. № 7. P. 168.
17. Гирш Э. Победа молекулярной биологии над здравым смыслом // *Полит.ру* 12.12.2013. URL: http://polit.ru/article/2013/12/12/hirsch_about_hirsch/ (дата обращения: 26.07.2014).
18. Быкова Н. Научную экспертизу доведут до автоматизма // «Наука и технологии России» (S&TRF) 23.06.2014. URL: http://strf.ru/material.aspx?CatalogId=223&d_no=81544#.VYLyZEUppun (дата обращения: 26.07.2014).
19. Технологические тренды 2013 // Пресс-релиз Массачусетского технологического института. URL: http://www.forinnovations.ru/upload/MIT_Emerging_Trends_Report_Rus_2013.pdf (дата обращения: 26.07.2014).

УДК 577.21

Регуляторные элементы в векторах для эффективного получения клеточных линий-продуцентов целевых белков

О. Г. Максименко, Н. Б. Гасанов, П. Г. Георгиев*

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

*E-mail: georgiev_p@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2015

РЕФЕРАТ В настоящее время все больше лекарственных препаратов производят в культурах клеток млекопитающих. С целью повышения уровня и стабильности экспрессии целевых рекомбинантных белков в клеточных культурах используют различные регуляторные элементы, механизмы действия которых пока недостаточно изучены. В обзоре охарактеризованы и обсуждены потенциальные механизмы действия таких регуляторных элементов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инсуляторы, рекомбинантные белки, продукция белков в клеточных линиях, UCOE, S/MAR, STAR.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РБ – рекомбинантный белок; СНО – культура клеток яичников китайского хомячка; НТО – нетранслируемая область гена; S/MAR – последовательности ДНК, ассоциированные с белками ядерного матрикса; инсуляторы – регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором; UCOE – регуляторные элементы, содержащие сильные промоторы генов «домашнего хозяйства»; STAR – регуляторные элементы, которые защищают от HP1-зависимой репрессии; MSX – L-метионинсульфоксимин; MTX – метотрексат.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические белки – это основные структурные и регуляторные молекулы, необходимые для нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Часть рекомбинантных белков небольших размеров и не требующих дополнительных модификаций производится в наиболее экономичном биореакторе – клетках кишечной палочки. Однако производство белков в бактериях связано с рядом ограничений: у некоторых белков нарушен фолдинг, не вносятся правильные модификации, невозможно производство крупных молекул [1, 2]. Часть этих ограничений снимается при использовании клеток дрожжей, в которых можно получить качественные рекомбинантные белки с достаточно низкой себестоимостью. Однако многие рекомбинантные белки человека должны подвергнуться определенным модификациям, возможным только при их экспрессии в клетках высших эукариот [3]. Поэтому в настоящее время все больше лекарственных препаратов получают в культурах клеток млекопитающих, выращенных в биореакторах, прежде всего, в клетках яичника китайского хомячка (СНО) [4, 5]. Впервые клетки СНО были выделены в 1957 году [6].

Вскоре стало понятно, что эти клетки оптимальны для масштабирования биомассы в процессе наработки рекомбинантных белков на уровне биореакторов, так как они нетребовательны к условиям культивирования. На основе первичного клона клеток СНО получены несколько линий, среди которых наибольшее распространение получила линия СНО-К1 [7]. С использованием данной линии были подобраны оптимальные условия для обеспечения высокой плотности роста клеток СНО в биореакторах, в результате чего удалось добиться значительного увеличения выхода продукта – целевого белка, при достаточно низкой вероятности передачи вирусов человека [1, 4, 5]. Однако основную проблему при производстве рекомбинантных белков в культурах клеток представляет крайне высокая себестоимость продукта, поэтому постоянно пытаются снизить затраты при получении высокопродуктивных клеточных культур и увеличить выход белкового продукта за счет повышения уровня экспрессии целевого белка и плотности клеточной культуры, а также снижения гибели клеток. Одно из таких направлений – усовершенствование векторов для получения трансгенов, что может значительно снизить себестоимость получения

клеточных линий-продуцентов. В настоящем обзоре рассмотрены регуляторные элементы, которые используются в векторных конструкциях, предназначенных для получения трансгенов.

ВЕКТОРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЦЕЛЕВЫЕ БЕЛКИ

Наибольшее распространение в промышленной биотехнологии получил метод трансфекции клеток линейаризованной плазмидной ДНК [3, 8], который позволяет получить клеточные линии, содержащие много копий экспрессионного вектора, обычно встроенных в один, реже – в несколько геномных сайтов. Механизм интеграции векторных конструкций в геном изучен не до конца. При попадании линейной ДНК в клеточные ядра происходит индукция систем репарации, которые обеспечивают сшивку концов линейных молекул ДНК по двум основным механизмам: гомологичной рекомбинации и соединения нехомологичных концов ДНК [9–11]. В результате формируются длинные линейные ДНК, содержащие несколько копий векторной конструкции, которые с некоторой вероятностью могут встраиваться в геном. Линейная ДНК с помощью механизма гомологичной рекомбинации может встраиваться в участок генома, в который ранее уже встроились другие копии такой же ДНК, что приводит к увеличению числа копий конструкции, интегрированных в одно место генома [12]. Таким образом, в один геномный сайт может встроиться до нескольких сотен копий векторной конструкции.

С целью повышения продуктивности клонов в промышленной биотехнологии используется селективное увеличение числа копий конструкции, которая обеспечивает экспрессию целевого белка [8]. Это достигается путем снижения функциональной активности репортерного гена, кодирующего фермент дигидрофолатредуктазу (DHFR), которая катализирует превращение дигидрофолата в тетрагидрофолат и необходима для биосинтеза глицина, пуринов и тимидиновой кислоты [13, 14]. Клеточные линии, ауксотрофные по дигидрофолатредуктазе, способны расти на среде, которая обязательно содержит глицин, источник пуринов (гипоксантин), и тимидин. Достаточно давно с помощью случайного мутагена за линии CHO-K1 была получена производная линия CHO-DG44 [15, 16], в которой мутированы оба аллеля гена, кодирующего дигидрофолатредуктазу. В результате появилась возможность использовать ген дигидрофолатредуктазы в качестве селекционного гена для получения клеточных линий-продуцентов. При этом для селективного увеличения количества копий экспрессионного вектора, обычно коррелирующего с повышением уровня экспрессии

целевого белка, применяют метотрексат (МТХ), способный избирательно ингибировать превращение дигидрофолата в тетрагидрофолат [2]. Обработка трансфицированных линий клеток метотрексатом приводит к тому, что выживают только клетки, в которых значительно повышен уровень дигидрофолатредуктазы. В большинстве случаев это происходит в результате увеличения числа копий гена *dhfr*, входящего в состав конструкции и, как следствие, гена, кодирующего целевой белок. Другой часто используемый селективный маркер – ген, кодирующий глутаминсинтазу (GS). При работе с этим маркером используют клеточные линии CHO-K1, содержащие мутантный аллель гена *gs*. В данном случае в качестве селективного агента, улучшающего отбор наиболее эффективных клонов, используется L-метионинсульфоксимин (MSX) [2].

Селекцию клонов можно проводить с использованием и других репортерных генов. Наиболее привлекательны варианты, в которых не надо выводить мутантную клеточную линию. В качестве такой системы можно рассматривать технологию с флуоресцентными белками [17, 18], которая позволяет по уровню свечения клеточного клона на определенной длине волны отбирать клетки, экспрессирующие целевой ген на максимальном уровне. С помощью этого подхода можно культивировать стабильные клеточные линии, которые, в отличие от мутантных производных, дефектных по генам *dhfr* и *gs*, имеют гораздо более высокий потенциал деления и жизнеспособность. К недостаткам применения в качестве селективных маркеров генов, кодирующих флуоресцентные белки, относится невозможность амплификации числа копий конструкции, что во многих случаях способствует увеличению продуктивности клеточного клона. В последнее время приступили к широкому использованию специальных роботов, способных отбирать отдельные клеточные клоны, наиболее эффективно экспрессирующие целевой белок, идентифицируемый с помощью антител [4]. Наряду с другими преимуществами, эта технология позволяет не использовать маркеры, экспрессия которых не всегда коррелирует с уровнем синтеза целевого белка.

Векторные конструкции разработаны также на основе вирусов, мобильных элементов, системы антифаговой защиты бактерий и систем рекомбинации фагов и дрожжей [3, 19]. Использование этих векторов позволяет вводить единичные инсерции целевого гена, в некоторых случаях – в заданный район генома, что широко применяют в генной терапии, при создании трансгенных клеточных линий и животных с целью получения модельных систем для изучения процессов регуляции экспрессии генов [20].

Основная проблема при получении клеточных линий-продуцентов, содержащих много копий экспрессионного вектора, – гетерохроматизация повторяющихся последовательностей векторных конструкций, которая часто усиливается в ряду клеточных делений. Основную роль в гетерохроматизации повторяющихся последовательностей ДНК играют РНК-интерференция и некодирующие РНК, которые могут стимулировать процесс формирования на промоторах зон репрессивного хроматина, метилирование CpG-сайтов в области промоторов, что снижает эффективность связывания транскрипционных факторов с данными участками [21–23]. В результате, через некоторое время после получения высокопродуктивных клеточных линий уровень экспрессии целевого белка в них может значительно снизиться. Одновременно формирование на повторяющихся копиях векторной конструкции зоны гетерохроматина может негативно влиять на активность клеточных генов, расположенных рядом, что часто приводит к снижению жизнеспособности клеточных линий-продуцентов. Репрессия транскрипции в интегрированных повторах векторной конструкции обусловлена защитной реакцией клетки на введение в геном чужеродной информации, экспрессию которой необходимо подавить. Таким образом, крайне актуальным представляется использование регуляторных элементов, способных поддерживать эффективную работу гена целевого белка и одновременно изолировать регуляторные элементы векторной конструкции от регуляторных элементов генома.

ПРОМОТОРЫ И ЭНХАНСЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ

Для экспрессии трансгена обычно используют сильные вирусные промоторы – цитомегаловирусный промотор (CMV) и ранний промотор вируса SV40, а также сильные клеточные промоторы генов «домашнего хозяйства», таких, как гены β -актина и фактора EF1 α [24].

Сильные вирусные и клеточные промоторы содержат минимальный промотор размером примерно 100 п.н., с которого начинается транскрипция, и сильный энхансер, расположенный в непосредственной близости от промотора. Так, наиболее часто используемый CMV-промотор состоит из коровой части, расположенной между позициями –62...–1 п.н. относительно начала транскрипции, и энхансера (от –544 до –63 п.н.) [25]. В области минимального промотора находятся несколько мотивов, которые определяют связывание с данной областью различных компонентов основного комплекса транскрипции (TFIID): TATA [26], INR [27], DPE [28], BRE [29],

DCE [30] и MTE [31]. Однако эти участки не относятся к обязательным, так как многие сильные промоторы не содержат этих элементов либо принадлежат к CG-богатым промоторам. Можно предположить, что существует практически неизученная группа так называемых архитектурных белков, определяющих способность корового промотора рекрутировать TFIID-комплекс [32]. К сожалению, архитектура промоторов на настоящий момент описана не в той мере, чтобы по последовательности определять способность минимального промотора эффективно связывать основные факторы транскрипции, необходимые для функционирования сильного промотора.

Один из подходов использования эффективных промоторов в биотехнологии – идентификация сильных промоторов непосредственно в тех клеточных культурах, на основе которых планируется получать продуценты целевых белков. Таким образом, был проведен полногеномный скрининг наиболее сильных промоторов в клетках СНО, наиболее часто используемых в качестве системы экспрессии в клетках млекопитающих [33–35]. Как и ожидалось, эффективными оказались промоторы генов «домашнего хозяйства», в том числе некоторых рибосомных генов. Однако подводным камнем такого подхода является довольно высокая вероятность того, что многие промоторы, идентифицированные с помощью полногеномного анализа, эффективно работают только в определенном участке генома («эффект положения») или содержат сложную регуляторную область, что сильно снижает привлекательность таких промоторов для использования в экспрессионных системах с целью получения требуемых белков в трансгенных линиях клеток СНО.

Одно из решений проблемы «эффекта положения» состоит в использовании длинных регуляторных последовательностей активно транскрибирующихся генов «домашнего хозяйства», расположенных с обеих сторон от кодирующей части. Так, высокий уровень экспрессии целевых белков (в 6–35 раз превышающий уровень, который обеспечивает стандартный промотор CMV) достигнут с помощью вектора, содержащего 12 т.п.н. регуляторной области гена EF1 α китайского хомячка и 4 т.п.н. 3'-области этого же гена [36]. Одной из проблем использования длинных регуляторных последовательностей с целью экспрессии целевого белка являются нестабильность больших векторов и снижение эффективности получения многокопийных линий, содержащих преимущественно полные конструкции, способные экспрессировать целевой белок. Перспективным представляется использование конструкции, содержащей длинные регуляторные участки ДНК из концевой повтора вируса Эпштейна–Барр, который на порядок усиливает

эффективность получения стабильно трансфицированных клеток [37].

Еще один интересный подход – искусственная модификация промоторов с целью усиления их активности. Например, показано, что сильный CMV-промотор находится под негативным контролем, который приводит к метилированию GC-участков в сайтах связывания транскрипционных факторов (ТФ), входящих в состав промоторов и, как следствие, к ингибированию рекрутирования ТФ на промотор. В результате активность CMV-промотора значительно снижается. Такой негативный эффект можно блокировать, встраивая между энхансером и коровыми участками CMV-промотора регуляторную последовательность, с которой связываются транскрипционные факторы, блокирующие процессы метилирования ДНК [38]. На основе двух CMV-промоторов создан эффективный промотор, состоящий из пары разнонаправленных коровых элементов, между которыми встроен один CMV-энхансер [39]. Такой двусторонний промотор способен с примерно одинаковой эффективностью экспрессировать два противоположно направленных гена, что имеет большое значение при продукции белков, состоящих из двух разных субъединиц (например, моноклональных антител).

Оригинальным способом повышения уровня экспрессии целевого белка является искусственное привлечение на промотор комплексов, ассоциированных с эффективной транскрипцией [40, 41]. Например, гистон-ацетилтрансфераза р300 связывается с активными энхансерами и промоторами и участвует в стимуляции транскрипции [42]. Рекрутирование р300 на промоторы значительно увеличивает эффективность получения стабильных клеточных клонов с высоким уровнем экспрессии репортерного гена [43]. Интересно, что противоположные результаты получены в аналогичных опытах с ремодулирующим комплексом Brahma, обеспечивающим повышение подвижности нуклеосом и способным позитивно/негативно регулировать транскрипцию в зависимости от конкретного гена.

В некоторых случаях с целью усиления транскрипции репортерного гена и снижения зависимости экспрессии трансгена от окружающего хроматина используются сильные клеточные энхансеры [44, 45]. Один из наиболее часто применяемых энхансеров – LCR (Locus Control Region), который контролирует экспрессию генов β -глобинового локуса человека [46]. Основным недостатком использования энхансеров для усиления уровня экспрессии трансгена обусловлен их специфичностью, т.е. функционированием только в определенных клеточных линиях, что накладывает определенные ограничения на их исполь-

зование в качестве универсальных регуляторных элементов. В этом направлении перспективен поиск энхансеров, наиболее эффективных в клеточных линиях, применяемых для наработки белков в промышленных масштабах [47].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИНСУЛЯТОРОВ В ПОВЫШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВОГО ГЕНА В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ-ПРОДУЦЕНТАХ

С целью увеличения эффективности и стабильности экспрессии целевого белка используют известные инсуляторы [41, 48–51]. Инсуляторами называются регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними [52, 53]. При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера и промотора, т.е. промотор может активироваться любым другим энхансером, а энхансер способен активировать любой другой промотор. Кроме того, часть инсуляторов может служить границей между транскрипционно активным хроматином и гетерохроматином. Наиболее хорошо изучены инсуляторы плодовой мушки дрозофилы и позвоночных. Исходно предполагали, что инсуляторы определяют границы транскрипционных доменов, внутри которых экспрессия генов не зависит от негативных эффектов окружающего генома [54, 55]. Однако в дальнейшем было показано, что инсуляторные белки значительно более гибко интегрированы в регуляторные системы генов [52, 53].

Недавно было обнаружено, что некоторые инсуляторные белки участвуют в организации специфичных дистанционных взаимодействий между удаленными участками хроматина [56–59]. Инсуляторные белки могут поддерживать взаимодействия между энхансерами и промоторами, границами транскрипционных доменов, которые часто располагаются на расстояниях, достигающих сотен тысяч пар нуклеотидов [34, 60–62]. Полученные результаты дали основания отнести инсуляторные белки к классу архитектурных белков хроматина [32, 53].

К настоящему моменту наиболее хорошо описаны инсуляторные/архитектурные белки (ИАБ) дрозофилы, что во многом связано с простотой получения трансгенных линий этих мух. Исследование свойств инсуляторов в трансгенных линиях дрозофилы показало, что с каждым инсулятором связывается несколько ИАБ, которые и определяют специфичность дистанционных взаимодействий [32, 53]. В результате два идентичных инсулятора способны достаточно специфично обеспечивать сверхдальние взаимодействия между регуляторными элементами в трансгенных линиях дрозофилы [63, 64], что позволило предложить модель, согласно которой ИАБ, специфичные

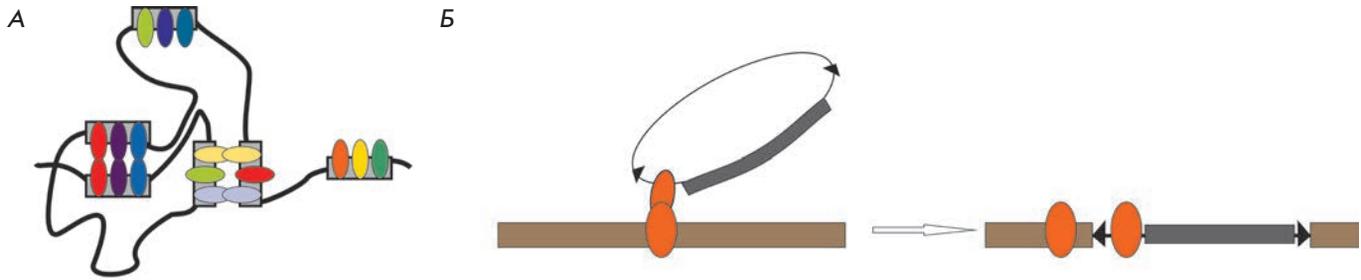


Рис. 1. А – модель установления специфичных дистанционных взаимодействий между регуляторными элементами. С каждым элементом связывается несколько ИАБ (инсуляторные архитектурные белки). В результате два одинаковых элемента способны высокоспецифично и эффективно обеспечивать сверхдальние взаимодействия между регуляторными элементами, при частичном совпадении сайтов связывания ИАБ в составе регуляторных элементов формируются более слабые контакты. Серые прямоугольники – регуляторные элементы, с которыми связываются ИАБ; разноцветные овалы – комбинации ИАБ, специфично связывающиеся со своими сайтами и взаимодействующие друг с другом. Б – специфичная интеграция трансгенной конструкции в определенное место генома. Трансгенная конструкция представлена в виде кольца. Черные треугольники – концы Р-транспозона, серый прямоугольник – элементы в составе трансгенной конструкции. Оранжевые овалы – регуляторный элемент, с которым связывается ИАБ. Коричневый прямоугольник – участок генома

сайты связывания которых входят в состав регуляторных элементов, создают код, определяющий, насколько эффективным будет установленное между данными регуляторными элементами дистанционное взаимодействие [32] (рис. 1А).

Обычно трансгенные линии дрозофилы получают путем инъекции вектора, содержащего концы Р-транспозона, которые фланкируют трансгенную конструкцию, вместе с геном, кодирующим транспозазу, необходимую для интеграции конструкции в геном [65]. Описаны случаи высокоспецифичной интеграции Р-транспозона, в состав которого входит инсулятор или сильный промотор, в определенный район генома, содержащий аналогичный эндогенный регуляторный элемент [66, 67]. Подобную высокоспецифичную интеграцию Р-транспозона, названную «возвращением домой» (homing), можно объяснить тем, что после введения конструкции в эмбрион с регуляторным элементом в составе Р-транспозона связывается ИАБ. В результате обеспечивается специфичное взаимодействие Р-транспозона с аналогичным эндогенным регуляторным элементом, и происходит интеграция транспозона в определенный район хромосомы (рис. 1Б).

Полногеномные исследования распределения сайтов связывания ИАБ однозначно показали, что инсуляторы не являются стационарными границами между транскрипционными доменами [62, 68]. В трансгенных линиях дрозофилы, клеточных линиях и в системе *in vitro* описаны два механизма, с помощью которых инсуляторы способны блокиро-

вать активность энхансеров [53]. Первый механизм основан на наведении топологических препятствий, блокирующих взаимодействия между энхансером и промотором. В результате образования стабильных контактов между инсуляторами один из взаимодействующих регуляторных элементов оказывается изолированным в независимой хроматиновой петле. Такой механизм действия инсуляторов обнаружили с помощью искусственно созданных инсуляторов, состоящих из сайтов связывания белков, способных эффективно взаимодействовать друг с другом и образовывать стабильные хроматиновые петли [69, 70], и в трансгенных линиях дрозофилы [71]. Этот механизм эффективно проявляется только в том случае, когда инсуляторы непосредственно соседствуют с блокируемыми элементами (энхансерами и промоторами). При увеличении размеров хроматиновой петли, формируемой инсуляторами, блокирование энхансера по такому механизму не происходит [72]. Второй механизм, более общий, основан на установлении прямых контактов между белками, связанными с инсулятором, и энхансер-промоторным комплексом. Например, показано, что в трансгенных линиях дрозофилы инсуляторы могут прямо взаимодействовать с промоторами и энхансерами [71, 73]. В данной ситуации, когда инсулятор находится между энхансером и промотором, инсуляторные белки мешают установлению правильных контактов между транскрипционными комплексами, собранными на энхансере и промоторе, что приводит к частичной или полной неспособности энхансера стимулировать транскрипцию с промотора.

Механизмы, определяющие барьерную функцию инсуляторов, описаны достаточно подробно у дрозофилы и млекопитающих. В частности, установлено, что ИАБ помогают рекрутировать на инсуляторы белковые комплексы, которые отвечают за ремоделирование и модификации нуклеосом [74–78], что в результате приводит к созданию зон открытого хроматина. Одновременно некоторые инсуляторы могут привлекать белковые комплексы, непосредственно принимающие участие в стимуляции транскрипции [75]. За счет создания свободных от нуклеосом участков ДНК и рекрутирования транскрипционных комплексов инсуляторы блокируют распространение репрессивного хроматина, что, тем не менее, не исключает возможности прямого взаимодействия инсуляторов с сайленсерами, иницирующими гетерохроматинизацию участков генома.

К настоящему времени описан только один инсуляторный ДНК-связывающий белок позвоночных, CTCF [79, 80], что, вероятно, связано с отсутствием удобных модельных систем для изучения инсуляторов. CTCF способен поддерживать дистанционные взаимодействия между удаленными участками хроматина [60, 79–81]. Таким образом, CTCF – первый охарактеризованный архитектурный белок в геноме млекопитающих [32, 80].

Несмотря на ключевую роль в формировании архитектуры хроматина, домены белка CTCF остаются слабо изученными, и механизм функционирования CTCF в процессе поддержания дистанционных взаимодействий до сих пор не охарактеризован. В центральной части белка расположены 11 цинковых пальцев (ZF) типа C2H2, из них только четыре (с четвертого по седьмой) необходимы для узнавания корового мотива ДНК [82]. Предполагается, что остальные цинковые пальцы также способны узнавать определенные нуклеотидные последовательности, стабилизируя тем самым связывание CTCF с ДНК. Наиболее логично предположить, что белок, поддерживающий дистанционные взаимодействия, способен к эффективной ди- или мультимеризации. Действительно, показано, что CTCF способен гомодимеризоваться, однако домен, ответственный за эту активность, не был локализован [83]. Также получены данные, согласно которым С-концевой домен белка CTCF прямо взаимодействует со своими цинковыми пальцами [84]. Однако такое взаимодействие не может быть высокоспецифичным, так как цинковые пальцы CTCF связываются со многими факторами транскрипции – CHD8, Sin3A, УВ-1 [85–87].

Предполагается, что существенную роль в организации дистанционных взаимодействий играет когезиновый комплекс [60, 80, 88, 89], взаимодействующий непосредственно с CTCF [90]. Когезиновый

комплекс рекрутируется на хроматин с помощью CTCF и способствует установлению дистанционных взаимодействий между геномными CTCF-сайтами. Эта модель согласуется с данными полногеномных исследований, показывающих высокую степень колокализации CTCF и субъединиц когезинов [91, 92]. Однако в экспериментах по инактивации CTCF наблюдается совсем незначительное снижение связывания когезинов с хроматином, что предполагает участие и других факторов транскрипции в рекрутировании когезинового комплекса на хроматин [92–94]. Более того, инактивация CTCF и когезинов приводит к разным нарушениям архитектуры хроматина [95, 96], что можно объяснить независимым функционированием этих белков.

В биотехнологии используют наиболее хорошо изученный инсулятор позвоночных, HS4, состоящий из 1200 п.н. и расположенный на 5'-конце β-глобинового локуса кур [97, 98] (рис. 2). В этом инсуляторе выявлен коровый участок из 250 п.н., обладающий полной инсуляторной активностью и содержащий пять фрагментов (FI, FII, FIII, FIV, FV), каждый из которых имеет функциональное значение. В участке FII идентифицирован сайт связывания белка CTCF, необходимого и достаточного для проявления энхансерблокирующей активности HS4 [99]. За способность создавать границу между активным хроматином и гетерохроматином отвечают белки USF1 и USF2, которые связываются в виде гетеродимера с районом FIV [100]. Показано, что USF рекрутирует белковые комплексы, которые отвечают за модификации гистонов, ассоциированных со стимуляцией транскрипции [100, 101]. С другими районами инсулятора HS4 (FI, FIII, FV) связывается белок BGP1/Vezf1, который имеет ДНК-связывающий домен, состоящий из цинковых пальцев [102]. Белок BGP1/Vezf1 защищает GC-богатые участки инсулятора от метилирования, которое нарушает связывание инсуляторных белков с ДНК и, как следствие, приводит к инактивации инсулятора. Согласно существующей модели BGP1/Vezf1 терминирует слабую транскрипцию из гетерохроматинового района, что может играть важную роль в защите β-глобинового локуса от распространения неактивного хроматина [103].

Инсулятор HS4 с момента его открытия активно использовали для защиты экспрессии трансгена в культурах клеток млекопитающих [98]. Две полные копии HS4 встроили в вектор для получения трансгенных животных, в молоке которых экспрессируется требуемый белок [104]. Показано, что инсулятор значительно увеличивал экспрессию целевых белков, но не влиял существенно на специфичность экспрессии трансгена только в молочной железе

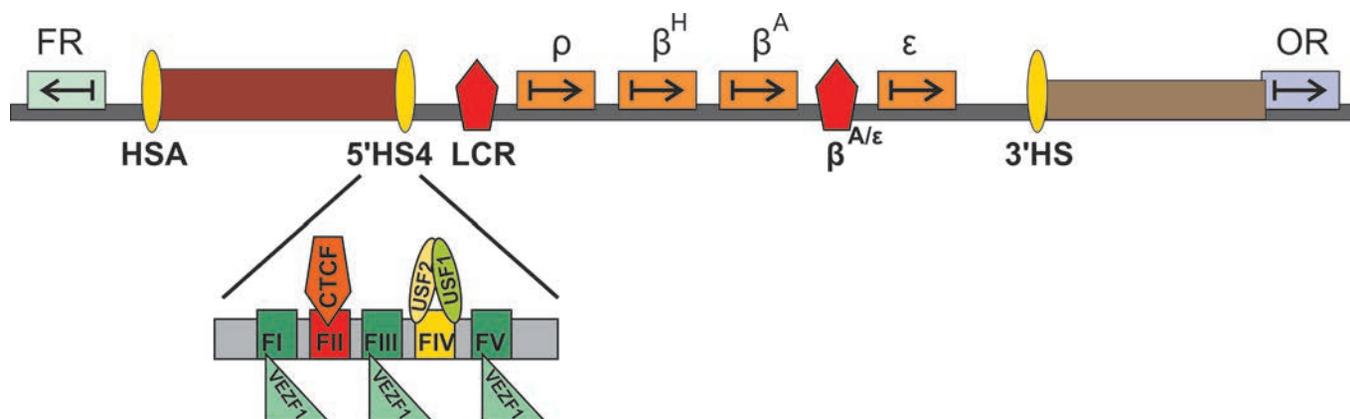


Рис. 2. Схема β-глобинового локуса и прилегающих последовательностей. ρ, β^H, β^A, ε соответствуют генам β-глобинового локуса; FR – ген фолатного рецептора; OR – ген обонятельного рецептора. Стрелками показано направление транскрипции генов. HSA, 5'HS4, 3'HS – инсультаторы; LCR, β^{A/ε} – энхансеры β-глобинового локуса. Детально представлена схема инсультатора HS4. FI, FIII, FV – участки связывания белка Vezf1/BGP1. FII и FIV – сайты связывания белка CTCF и гетеродимера USF1/2 соответственно

и не поддерживал прямую корреляцию между количеством копий конструкции и уровнем наработки целевого белка [105].

Наиболее эффективно инсультатор HS4 можно применять в векторах, размер которых по каким-либо причинам ограничен. Так, при использовании полного инсультатора размером 1.2 т.п.н. значительно снижается эффективность трансформации клеток лентивирусными векторами (возможно, из-за ограничений, накладываемых на размер вирусной частицы). Поэтому в векторах этого класса используют дублированный коровый элемент HS4 размером 250 п.н., который содержит сайты связывания всех идентифицированных факторов транскрипции, необходимых для проявления активности инсультатора [98, 106]. Инсультаторы также с успехом использовали для защиты экспрессии репортерного гена в векторах, созданных на основе мобильных элементов [51] и ретровирусов [107].

Несмотря на примеры успешного использования 1.2 т.п.н. инсультатора HS4 или его корового участка [98, 108], получены многочисленные данные, согласно которым HS4 не оказывал положительного воздействия на экспрессию целевого гена. Это можно объяснить тем, что используемые клеточные культуры значительно различаются по набору факторов транскрипции, способных связываться с инсультатором HS4.

В заключение можно постулировать, что основными механизмами защиты экспрессии трансгена с помощью инсультатора HS4 являются: 1) создание свободного от нуклеосом участка ДНК, который может прерывать линейное распространение гетерохроматина; 2) рекрутирование белковых комплексов, которые увеличивают подвижность нуклеосом, мо-

дифицируют гистоны, стимулируют транскрипцию, защищают от метилирования CpG-участки и терминируют слабую транскрипцию. Не установлено, способен ли инсультатор HS4 направлять интеграцию конструкции в зоны транскрипционно активного хроматина и непосредственно взаимодействовать с промотором целевого гена для последующей стимуляции транскрипции. Очевидно, что основным недостатком HS4 и других инсультаторов является зависимость их активности от набора конкретных факторов транскрипции, которые экспрессируются в данной клеточной линии.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА С ПОМОЩЬЮ А/Т-БОГАТЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БЕЛКАМИ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА (S/MAR)

С целью увеличения эффективности трансформации и повышения стабильности экспрессии трансгена [108–110] с начала 1990-х годов широко используются последовательности (300–5000 п.н.), обычно А/Т-богатые, которые, как показано в опытах *in vitro*, взаимодействуют с фракцией ядерного матрикса (S/MAR, scaffold matrix attachment region). S/MAR обладают рядом характерных свойств: это А/Т-богатые, чувствительные к ДНКазе I участки, потенциально склонные к формированию левозакрученной спирали и триплексных структур [111, 112]. Предполагается, что именно А/Т-богатый состав данных элементов приводит к дестабилизации двойной спирали и способности MAR формировать участки, насыщенные различными вторичными структурами [113, 114].

Исходя из особенностей вторичной структуры, в геноме человека было предсказано порядка 50000

элементов, предположительно обладающих свойствами S/MAR [115, 116]. Из этого пула участков отобрали 1500, максимально соответствующих особенностям S/MAR. Оказалось, что только несколько из них обладают высокой степенью гомологии с мышинными ортологами, т.е. нуклеотидная последовательность в участках S/MAR не обладает выраженными консервативными элементами.

Структура S/MAR-элементов предполагает, что они могут быть горячими точками рекомбинации. Действительно, показано, что места разрывов при инверсиях, связанных с болезнями человека, часто находятся в области S/MAR-элементов [117, 118], а интеграция ретровирусов в геном с высокой частотой происходит в непосредственной близости от S/MAR [119, 120]. Согласно некоторым данным S/MAR участвуют в регуляции репликации ДНК [121–123]. Установлено, что S/MAR-элементы увеличивают экспрессию трансгена и уменьшают вариабельность экспрессии в процессе получения стабильных клеточных линий [41, 124]. Экспериментально показано, что экспрессия гена, окруженного S/MAR-элементами, пропорциональна числу копий гена [125]. Предположили, что функционально S/MAR-элементы можно рассматривать как инсульты, защищающие экспрессию трансгена от позитивных/негативных эффектов окружающего хроматина.

Исходно считалось, что основным компонентом белков ядерного матрикса являются ламинины [126]. Впоследствии в составе ядерного матрикса обнаружили много дополнительных белков, в том числе факторов транскрипции [127]. В S/MAR часто находятся сайты связывания транскрипционных факторов SATB1, Fast1, СЕВР, SAF-A и SAF-B (белки, которые предпочтительно связываются с А/Т-богатыми участками), NMP4 (белок матрикса), CTCF и белков Нох-семейства [83, 116, 128–131]. Топоизомераза II также преимущественно связывается с А/Т-богатыми участками S/MAR [132–134]. Снижение плотности распределения нуклеосом на S/MAR-элементах и повышение концентрации комплексов, ацетилирующих гистоны, объясняется связыванием многочисленных транскрипционных факторов и способностью этих элементов формировать вторичные структуры.

SATB1 – наиболее хорошо изученный белок матрикса, вовлеченный во многие биологические процессы, такие, как дифференцировка Т-клеток и эпидермиса [135–137]. SATB1 можно отнести к классу архитектурных белков, способных поддерживать специфичные дистанционные взаимодействия [135]. SATB1 образует гомодимеры и связывается с А/Т-богатыми последовательностями с помощью двух CUT-доменов и С-концевого гомеобокса. Помимо

участия в формировании хроматиновых доменов, SATB1 рекрутирует ASF1 (АТФ-зависимый фактор, участвующий в организации хроматина) и комплекс ISWI (повышает подвижность нуклеосом) [128, 138].

Другой белок матрикса SAF-A содержит ДНК-связывающий (SAF) и РНК-связывающий (RGG) домены. Интересно, что РНК Xist, регулирующая дозовую компенсацию у млекопитающих, связывается с RGG-доменом. Это взаимодействие определяет локализацию РНК Xist на X-хромосоме [139]. Согласно существующей модели [140] SAF-A рекрутирует РНК Xist на S/MAR-элемент, расположенный в районе участка инициации формирования гетерохроматина на X-хромосоме. В результате взаимодействий белков SAF-A и SATB1 в дальнейшем формируются петли между соседними S/MAR-комплексами, что в итоге приводит к распространению РНК Xist по X-хромосоме и ее последующей инактивации.

Согласно наиболее распространенной модели S/MAR-элементы взаимодействуют с белками ядерного скелета (матриксными белками), что приводит к формированию хроматиновых петель, основанием которых являются S/MAR [141]. Предполагается, что гены, находящиеся внутри хроматиновой петли, формируемой S/MAR, защищены от негативного эффекта окружающего хроматина [109]. Однако до настоящего момента непонятна структура самого ядерного матрикса и роль S/MAR в организации архитектуры хромосом. Согласно современным представлениям матрикс представляет собой лабильные конгломераты белков, с которыми транзитно взаимодействуют белковые комплексы S/MAR, входящие в состав хромосом [141].

Несмотря на отсутствие понимания механизмов действия S/MAR, получены многочисленные экспериментальные данные, показавшие эффективность использования этих элементов для увеличения уровня экспрессии целевых белков в культуре клеток млекопитающих [142]. Например, S/MAR из гена лизоцима куриного яйца в 5–10 раз увеличивают уровень экспрессии моноклональных антител в клетках CHO [109, 143]. В дальнейшем были охарактеризованы более эффективные S/MAR млекопитающих [144]. S/MAR успешно использовали для увеличения уровня экспрессии эритропоэтина, человеческого рогового фактора, рецептора II типа TGF-β [108]. При этом оказалось, что S/MAR функционируют как в вирусных векторах [145], так и векторах, созданных на основе мобильных элементов [146]. S/MAR эффективно защищают экспрессию трансгена от репрессии (барьерная активность), а также поддерживают более высокий уровень транскрипции с промоторов в составе экспрессирующих векторов (стимулирующая активность) [144].

Некоторые S/MAR способны повышать эффективность интеграции векторной конструкции в хромосомы [147, 148]. Более того, S/MAR могут обеспечивать интеграцию новых дополнительных копий векторных конструкций в район, в котором уже находятся встроенные копии конструкции. Наиболее вероятным объяснением этого свойства S/MAR может быть то, что взаимодействие между архитектурными белками (такими, как SAF-A и SATB1) обеспечивает контакт между копиями S/MAR, которые находятся в геноме и плазмиде (аналог описанного выше феномена homing-эффекта у дрозофилы). Вероятно, что повышенная рекомбинационная активность, обеспечиваемая S/MAR-элементами, усиливает эффективность интеграции трансгена в определенные участки генома. Таким образом, позитивное влияние S/MAR на экспрессию трансгена может в значительной степени определяться направленной интеграцией векторной конструкции в S/MAR-содержащие районы, обычно транскрипционно активные. Такой вывод согласуется с наблюдением, согласно которому многие исследованные S/MAR позитивно влияют на экспрессию генов только при интеграции конструкции в геном [125, 144]. Для увеличения степени амплификации конструкции в клеточных клонах S/MAR объединили с районом инициации репликации у млекопитающих [149, 150]. Обработка первичных трансфектантов MTX позволила добиться масштабной амплификации конструкций в клеточных клонах, что приводило к многократному стабильному увеличению продукции целевого белка [150].

В заключение можно сделать вывод, что S/MAR – это регуляторные элементы, менее изученные по сравнению с инсуляторами. Наиболее вероятными механизмами действия S/MAR в процессе повышения уровня экспрессии трансгена являются: 1) направленная интеграция S/MAR-содержащих конструкций в районы транскрипционно активного хроматина и увеличение числа копий интегрированной конструкции; 2) связывание с элементами комплексов S/MAR, которые наводят зоны транскрипционно активного хроматина и тем самым блокируют распространение гетерохроматина; 3) прямая активация промотора транскрипционными факторами, которые непосредственно связываются с S/MAR.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ СИЛЬНЫЕ ПРОМОТОРЫ ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА»

В 2000–2002 годах небольшая компания Cobra Therapeutics разработала технологическую платформу для создания эффективных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе

регуляторных элементов, выделенных из промоторов генов «домашнего хозяйства», которые активно работают на всех стадиях развития и во всех клетках организма [45]. Такие регуляторные элементы названы «элементами с открытым хроматином» (ubiquitous chromatin opening elements, UCSOE), так как для промоторных областей активно транскрибирующихся генов характерна низкая плотность нуклеосом, связанная непосредственно с присутствием ДНК-связывающих ТФ, стимулирующих транскрипцию. К наиболее хорошо охарактеризованному UCSOE относятся области ДНК, содержащие разнонаправленные пары промоторов генов *HNRPA2B1* и *CBX3* или *TBP* и *PSNB1*, которые интенсивно транскрибируются во всех клетках организма [151]. В первых экспериментах использовали большие регуляторные элементы размером 12–16 т.п.н., которые значительно увеличивали процент трансфицированных клеток и обеспечивали высокую и стабильную экспрессию трансгена на протяжении длительного времени культивирования клеточных клонов [151, 152]. Так, UCSOE в 16 раз усиливают эффективность работы промотора CMV, часто подверженного ингибированию путем РНК-интерференции и метилирования CpG-районов [152, 153]. Показано, что UCSOE могут поддерживать высокий уровень экспрессии трансгена, встроенного в прицентромерный гетерохроматин. UCSOE эффективны в составе лентивирусных векторов [154–159]. Можно предположить, что с UCSOE связываются транскрипционные факторы, привлекающие комплексы, которые предотвращают метилирование CpG-повторов и создают участок хроматина с пониженной плотностью нуклеосом в области промоторов в составе лентивирусных векторов [155, 160].

Нужно отметить, что промоторы генов «домашнего хозяйства» способны эффективно функционировать в различных клеточных линиях, в отличие от других регуляторных элементов, таких, как LCR и энхансеры, которые проявляют выраженную клеточную специфичность. В результате экспериментов по уменьшению размеров UCSOE, необходимых для оценки возможности использования UCSOE в экспрессионных векторах, получены более компактные варианты UCSOE размером 1.5–3 т.п.н. Такие укороченные элементы полностью сохраняют свою активность в процессе получения высокопродуктивных клеточных линий [152].

UCSOE – активный участник процесса регуляции транскрипции, что подразумевает существование прямых взаимодействий между регуляторными элементами промотора, ответственного за экспрессию репортерного гена в составе вектора, и транскрипционных факторов, связанных с UCSOE. Вследствие этого UCSOE может эффективно работать только с опре-

деленными промоторами, и их функциональная активность не распространяется на все клеточные линии [161]. В некоторых работах показано, что сами UCOE могут использоваться в качестве промоторов для обеспечения стабильной экспрессии репортерного гена [162]. Однако непонятна роль и неоднозначен вклад в экспрессию трансгена транскрипции, индуцируемой с промоторов, входящих в состав UCOE. В частности, существуют экспериментальные данные, согласно которым UCOE не всегда эффективно усиливают уровень экспрессии целевого белка в клетках CHO [162, 163]. Негативные результаты, получаемые при использовании UCOE, можно объяснить тем, что сильные промоторы, входящие в состав UCOE, индуцируют транскрипцию, способную в ряде случаев инициировать РНК-интерференцию и/или рекрутирование репрессивных комплексов на промотор, с которого транскрибируется репортерный ген.

Показано также, что совмещение двух сильных промоторов может в некоторых случаях способствовать получению стабильных клеточных линий и увеличивать уровень экспрессии трансгена [164]. Анализ различных комбинаций двух промоторов: CMV, SV40, RPL32, EF1 α и β -актина, показал, что только промотор гена RPL32, встроенный перед любым из проверяемых промоторов, способен значительно увеличить эффективность отбора стабильных клеточных клонов. Интересно, что направление промотора RPL32 должно совпадать с направлением промотора, ответственного за экспрессию репортерного гена, и коровые элементы промотора RPL32 в данном случае являются необходимыми компонентами системы для обеспечения стимулирующего эффекта.

В целом, комбинация сильных промоторов – перспективный способ увеличения эффективности получения клеточных клонов-продуцентов целевых белков. Сильные промоторы, состоящие из комбинации энхансера и корового промотора, рекрутируют белковые комплексы, которые, в свою очередь, поддерживают транскрипционно активное состояние хроматина. Согласно данным полногеномных исследований промоторы служат эффективными границами, способными обеспечивать защиту районов генома от распространения зон репрессивного хроматина [165, 166]. Транскрипционные факторы, которые связываются с правильно подобранными парами промоторов, могут взаимно усиливать активность друг друга. Вероятно, использование некоторых промоторов может приводить к преимущественной интеграции конструкции в определенные места хромосом, в которых уровень транскрипции достигает наиболее высоких уровней. Более полное понимание механизмов активации транскрипции позволит в дальнейшем

модифицировать промоторы с целью увеличения их эффективности при работе с экспрессионными системами.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ЗАЩИЩАЮЩИХ ОТ HP1-ЗАВИСИМОЙ РЕПРЕССИИ

Компания Chromagenic разработала технологическую платформу, основанную на тест-системе, которая позволяет эффективно идентифицировать регуляторные элементы, обладающие способностью блокировать распространение зон гетерохроматина [45]. Тест-система основана на рекрутировании белка HP1, ответственного за формирование гетерохроматина, на плазмиду с помощью ДНК-связывающего домена белка Lex [167]. Химерный белок HP1-Lex связывается с lex-сайтами на плазмиде и привлекает другие компоненты гетерохроматинового комплекса, что и приводит к запуску инактивации расположенного рядом промотора. В результате происходит репрессия гена *zeo^R*, ответственного за устойчивость к антибиотику зеоцину (Zeocin), и гибель трансфицированных клеток при культивировании на селективной среде с добавлением зеоцина. Скрининг, направленный на поиск фрагментов ДНК, встраивание которых между сайтами связывания Lex и промотором гена *zeo^R* обеспечивает защиту промотора от HP1-зависимой репрессии, позволил найти серию регуляторных элементов размером от 500 до 2000 п.н., названных антирепрессорами (STAR). Другие известные регуляторные элементы, инсулятор HS4, MAR и UCOE, не обладают такой способностью. Сравнительный анализ различных регуляторных элементов [168] показал, что STAR-элементы наиболее эффективны при создании высокопродуктивных клеточных линий CHO. Однако механизм действия STAR-элементов остается неизученным. До сих пор не установлено, какие транскрипционные факторы связываются с элементами данного класса и обеспечивают их функциональную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени не найдены универсальные регуляторные элементы с понятным механизмом действия, которые можно эффективно использовать в составе векторных конструкций всех типов, предназначенных для получения высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов различных белков. Во многом это связано со сложностью механизмов, регулирующих активность промоторов, а также с отсутствием фактических подтверждений первоначальных представлений о строгой организации генов с одинаковым профилем экспрессии в транс-

крипционные домены, ограниченные особыми регуляторными элементами класса инсультаторов или S/MAR. Очевидно, что даже для самых сильных промоторов должны существовать механизмы супрессии «чрезмерной» транскрипции. Один из таких механизмов – РНК-интерференция. Возможно, детальное понимание механизмов активации и супрессии транскрипции позволит создать искусственные про-

моторы, с помощью которых реальным станет получение стабильно высоких уровней экспрессии целевого гена в трансгенных системах. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Demain A.L., Vaishnav P. // *Biotech. Advances*. 2009. V. 27. P. 297–306.
- Durocher Y., Butler M. // *Curr. Opin. Biotech.* 2009. V. 20. P. 700–707.
- Khan K.H. // *Adv. Pharm. Bull.* 2013. V. 3. P. 257–263.
- Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. P. 917–930.
- Hacker D.L., De Jesus M., Wurm F.M. // *Biotechnol. Adv.* 2009. P. 1023–1027.
- Tjio J.H., Puck T.T. // *J. Exp. Med.* 1958. V. 108. P. 259–271.
- Kao F.T., Puck T.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1968. V. 60. P. 1275–1281.
- Browne S.M., Al-Rubeai M. // *Trends Biotech.* 2007. V. 25. P. 425–432.
- Folger K.R., Wong E.A., Wahl G., Capecchi M.R. // *Mol. Cell Biol.* 1982. V. 2. P. 1372–1387.
- Folger K.R., Thomas K., Capecchi M.R. // *Mol. Cell Biol.* 1985. V. 5. P. 59–69.
- Robins D.M., Ripley S., Henderson A.S., Axel R. // *Cell*. 1981. V. 23. P. 29–39.
- Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R. // *Cell*. 1986. V. 44. P. 419–428.
- Hayward B.E., Hussain A., Wilson R.H., Lyons A., Woodcock V., McIntosh B., Harris T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 999–1008.
- Wuest D.M., Harcum S.W., Lee K.H. // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 629–638.
- Urlaub G., Chasin L.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 4216–4220.
- Urlaub G., Kas E., Carothers A.M., Chasin L.A. // *Cell*. 1983. V. 33. P. 405–412.
- Inouye S., Tsuji F.I. // *FEBS Lett.* 1994. V. 341. P. 277–280.
- Stepanenko O.V., Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Uversky V.N., Turoverov K.K. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2008. V. 9. P. 338–369.
- Niu J., Zhang B., Chen H. // *Mol. Biotechnol.* 2014. V. 56. P. 681–688.
- Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1842. P. 1942–1950.
- Castel S.E., Martienssen R.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. P. 100–112.
- Fatica A., Bozzoni I. // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 7–21.
- Morris K.V., Mattick J.S. // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 423–437.
- Lai T., Yang Y., Ng S.K. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013. V. 6. P. 579–603.
- Bradley A.J., Lurain N.S., Ghazal P., Trivedi U., Cunningham C., Baluchova K., et al. // *J. Gen. Virol.* 2009. V. 90. P. 2375–2380.
- Goldberg M.L. *Sequence Analysis of Drosophila Histone Genes*: PhD thesis. Stanford University, 1979.
- Corden J., Wasylyk B., Buchwalder A., Sassone-Corsi P., Kedinger C., Chambon P. // *Science*. 1980. V. 209. P. 1406–1414.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 711–724.
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H., Reinberg D., Ebricht R.H. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 34–44.
- Lewis B.A., Kim T.K., Orkin S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 7172–7177.
- Lim C.Y., Santoso B., Boulay T., Dong E., Ohler U., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1606–1617.
- Maksimenko O., Georgiev P. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 28.
- Xu X., Nagarajan H., Lewis N.E., Pan S., Cai Z., Liu X., Chen W., Xie M., Wang W., Hammond S., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 735–741.
- Becker J., Hackl M., Rupp O., Jakobi T., Schneider J., Szczepanowski R., Bekel T., Borth N., Goesmann A., Grillari J., et al. // *J. Biotechnol.* 2011. V. 156. P. 227–235.
- Jakobi T., Brinkrolf K., Tauch A., Noll T., Stoye J., Pühler A., Goesmann A. // *J. Biotechnol.* 2014. V. 190. P. 64–75.
- Running Deer J., Allison D.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. P. 880–889.
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. // *BMC Biotechnol.* 2014. V. 14. P. 56.
- Mariati, Koh E.Y., Yeo J.H., Ho S.C., Yang Y. // *Bioengineered*. 2014. V. 5. P. 340–345.
- Andersen C.R., Nielsen L.S., Baer A., Tolstrup A.B., Weilguny D. // *Mol. Biotechnol.* 2011. V. 48. P. 128–137.
- de Groote M.L., Verschure P.J., Rots M.G. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 10596–10613.
- Kwaks T.H., Otte A.P. // *Trends Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 137–142.
- Holmqvist P.H., Mannervik M. // *Transcription*. 2013. V. 4. P. 18–23.
- Kwaks T.H., Sewalt R.G., van Blokland R., Siersma T.J., Kasiem M., Kelder A., Otte A.P. // *J. Biotechnol.* 2005. V. 115. P. 35–46.
- Moltó E., Fernández A., Montoliu L. // *Brief Funct. Genomic Proteomic*. 2009. V. 8. P. 283–296.
- Palazzoli F., Bire S., Bigot Y., Bonnin-Rouleux F. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 593–597.
- Kim A., Dean A. // *Mol. Cells*. 2012. V. 34. P. 1–5.
- Vishwanathan N., Le H., Le T., Hu W.S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 30. P. 113–119.
- Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C.M. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 796–807.
- Emery D.W. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. P. 761–774.
- Furlan-Magaril M., Rebollar E., Guerrero G., Fernández A., Moltó E., González-Buendía E., Cantero M., Montoliu L.,

- Recillas-Targa F. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 89–103.
51. Bire S., Ley D., Casteret S., Mermod N., Bigot Y., Rouleux-Bonnin F. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e82559.
52. Chetverina D., Aoki T., Erokhin M., Georgiev P., Schedl P. // *BioEssays.* 2014. V. 36. P. 163–172.
53. Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 8–14.
54. Labrador M., Corces V.G. // *Cell.* 2002. V. 111. P. 151–154.
55. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // *Science.* 2001. V. 291. P. 447–450.
56. Handoko L., Xu H., Li G., Ngan C.Y., Chew E., Schnapp M., Lee C.W., Ye C., Ping J.L., Mulawadi F., et al. // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. P. 630–638.
57. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. // *Nature.* 2012. V. 485. P. 376–380.
58. Sanyal A., Lajoie B.R., Jain G., Dekker J. // *Nature.* 2012. V. 489. P. 109–113.
59. Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G., et al. // *Cell.* 2012. V. 148. P. 458–472.
60. Holwerda S., de Laat W. // *Front. Genet.* 2012. V. 3. P. 217.
61. Nora E.P., Dekker J., Heard E. // *BioEssays.* 2013. V. 35. P. 818–828.
62. Gibcus J.H., Dekker J. // *Mol. Cell.* 2013. V. 49. P. 773–782.
63. Kravchenko E., Savitskaya E., Kravchuk O., Parshikov A., Georgiev P., Savitsky M. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 9283–9291.
64. Li H.B., Müller M., Bahechar I.A., Kyrchanova O., Ohno K., Georgiev P., Pirrotta V. // *Mol. Cell Biol.* 2011. V. 31. P. 616–625.
65. Venken K.J., Bellen H.J. // *Meth. Mol. Biol.* 2012. V. 859. P. 203–228.
66. Fujioka M., Wu X., Jaynes J.B. // *Development.* 2009. V. 136. P. 3077–3087.
67. Fujioka M., Sun G., Jaynes J.B. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. e1003883.
68. Tanay A., Cavalli G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. P. 197–203.
69. Ameres S.L., Drupeppel L., Pfliederer K., Schmidt A., Hillen W., Berens C. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 358–367.
70. Bondarenko V.A., Jiang Y.I., Studitsky V.M. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 4728–4737.
71. Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. e1003606.
72. Savitskaya E., Melnikova L., Kostuchenko M., Kravchenko E., Pomerantseva E., Boikova T., Chetverina D., Parshikov A., Zobacheva P., Gracheva E., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26. P. 754–761.
73. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Development.* 2011. V. 138. P. 4097–4106.
74. Nakayama T., Shimojima T., Hirose S. // *Development.* 2012. V. 139. P. 4582–4590.
75. Ghirlando R., Giles K., Gowher H., Xiao T., Xu Z., Yao H., Felsenfeld G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1819. P. 644–651.
76. Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 5717–5730.
77. Yajima M., Fairbrother W.G., Wessel G.M. // *Development.* 2012. V. 139. P. 3613–3622.
78. Li M., Belozherov V.E., Cai H.N. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 1067–1076.
79. Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development.* 2012. V. 139. P. 1045–1057.
80. Merckenschlager M., Odom D.T. // *Cell.* 2013. V. 152. P. 1285–1297.
81. Chaumeil J., Skok J.A. // *Curr. Opin. Immunol.* 2012. V. 24. P. 153–159.
82. Nakahashi H., Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. P. 1678–1689.
83. Yusufzai T.M., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 8620–8624.
84. Pant V., Kurukuti S., Pugacheva E., Shamsuddin S., Mariano P., Renkawitz R., Klenova E., Lobanekov V., Ohlsson R. // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. P. 3497–3504.
85. Chernukhin I.V., Shamsuddin S., Robinson A.F., Carne A.F., Paul A., El-Kady A.I., Lobanekov V.V., Klenova E.M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 29915–29921.
86. Lutz M., Burke L.J., Barreto G., Goeman F., Greb H., Arnold R., Schultheiss H., Brehm A., Kouzarides T., Lobanekov V., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 1707–1713.
87. Ishihara K., Oshimura M., Nakao M. // *Mol. Cell.* 2006. V. 23. P. 733–742.
88. Mehta G.D., Kumar R., Srivastava S., Ghosh S.K. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 2299–2312.
89. Lee B.K., Iyer V.R. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 30906–30913.
90. Xiao T., Wallace J., Felsenfeld G. // *Mol. Cell Biol.* 2011. V. 31. P. 2174–2183.
91. Parelho V., Hadjur S., Spivakov M., Leleu M., Sauer S., Gregson H.C., Jarmuz A., Canzonetta C., Webster Z., Nesterova T., et al. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 422–433.
92. Wendt K.S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., et al. // *Nature.* 2008. V. 451. P. 796–801.
93. Hadjur S., Williams L.M., Ryan N.K., Cobb B.S., Sexton T., Fraser P., Fisher A.G., Merckenschlager M. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 410–413.
94. Nativio R., Wendt K.S., Ito Y., Huddleston J.E., Uribe-Lewis S., Woodfine K., Krueger C., Reik W., Peters J.M., Murrell A. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. e1000739.
95. Zuin J., Dixon J.R., van der Reijden M.I., Ye Z., Kolovos P., Brouwer R.W., van de Corput M.P., van de Werken H.J., Knoch T.A., van IJcken W.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 996–1001.
96. Gosalia N., Neems D., Kerschner J.L., Kosak S.T., Harris A. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 9612–9622.
97. Chung J.H., Bell A.C., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 575–580.
98. Emery D.W., Yannaki E., Tubb J., Stamatoyannopoulos G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 9150–9155.
99. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // *Cell.* 1999. V. 98. P. 387–396.
100. West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D., Felsenfeld G. // *Mol. Cell.* 2004. V. 16. P. 453–463.
101. Huang S., Li X., Yusufzai T.M., Qiu Y., Felsenfeld G. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 7991–8002.
102. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A.G. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. e1000804.
103. Giles K.E., Gowher H., Ghirlando R., Jin C., Felsenfeld G. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 2010. V. 75. P. 1–7.
104. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. // *Acta Naturae.* 2013. T. 5. № 1(16). С. 33–47.
105. Rival-Gervier S., Pantano T., Viglietta C., Maeder C., Prince S., Attal J., Jolivet G., Houdebine L.M. // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 723–730.
106. Hanawa H., Yamamoto M., Zhao H., Shimada T., Persons D.A. // *Mol. Therapy.* 2009. V. 17. P. 667–674.

107. Aker M., Tubb J., Groth A.C., Bukovsky A.A., Bell A.C., Felsenfeld G., Kiem H.P., Stamatoyannopoulos G., Emery D.W. // *Hum. Gene Ther.* 2007. V. 18. P. 333–343.
108. Kim J.M., Kim J.S., Park D.H., Kang H.S., Yoon J., Baek K., Yoon Y. // *J. Biotech.* 2004. V. 107. P. 95–105.
109. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. // *Biotech. Bioeng.* 2005. V. 91. P. 1–11.
110. Harraghy N., Gaussin A., Mermod N. // *Curr. Gene Ther.* 2008. V. 8. P. 353–366.
111. Wang T.Y., Han Z.M., Chai Y.R., Zhang J.H. // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. P. 3553–3560.
112. Bode J., Schlake T., Rios-Ramirez M., Mielke C., Stengert M., Kay V., Klehr-Wirth D. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162. P. 389–454.
113. Platts A.E., Quayle A.K., Krawetz S.A. // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2006. V. 11. P. 191–213.
114. Evans K., Ott S., Hansen A., Koentges G., Wernisch L. // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. P. 71.
115. Liebich I., Bode J., Frisch M., Wingender E. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 372–374.
116. Girod P.-A., Nguyen D.-Q., Calabrese D., Puttini S., Grandjean M., Martinet D., Regamey A., Saugy D., Beckmann J.S., Bucher P., et al. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 747–753.
117. Welsh P.L., King M.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 705–713.
118. Iarovaia O.V., Shkumatov P., Razin S.V. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 4583–4590.
119. Kulkarni A., Pavithra L., Rampalli S., Mogare D., Babu K., Shiekh G., Ghosh S., Chattopadhyay S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 322. P. 672–677.
120. Johnson C.N., Levy L.S. // *Virology.* 2005. V. 2. P. 68.
121. Koina E., Piper A. // *J. Cell Biochem.* 2005. V. 95. P. 391–402.
122. Mearini G., Chichiarelli S., Zampieri M., Masciarelli S., D'Erme M., Ferraro A., Mattia E. // *FEBS Lett.* 2003. V. 547. P. 119–124.
123. Piechaczek C., Fetzter C., Baiker A., Bode J., Lipps H.J. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 426–428.
124. Galbete J.L., Buceta M., Mermod N. // *Mol. Biosyst.* 2009. V. 5. P. 143–150.
125. Bode J., Benham C., Knopp A., Mielke C. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2000. V. 10. P. 73–90.
126. Berezney R., Coffey D.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974. V. 60. P. 1410–1417.
127. Albrethsen J., Knol J.C., Jimenez C.R. // *J. Proteomics.* 2009. V. 72. P. 71–81.
128. Cai S., Han H.J., Kohwi-Shigematsu T. // *Nat. Genet.* 2003. V. 34. P. 42–51.
129. Renz A., Fackelmayer F.O. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 843–849.
130. Agrelo R., Souabni A., Novatchkova M., Haslinger C., Leeb M., Komnenovic V., Kishimoto H., Gresh L., Kohwi-Shigematsu T., Kenner L., et al. // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. P. 507–516.
131. Arope S., Harraghy N., Pjanic M., Mermod N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e79262.
132. Berrios M., Osheroff N., Fisher P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 4142–4146.
133. Feister H.A., Onyia J.E., Miles R.R., Yang X., Galvin R., Hock J.M., Bidwell J.P. // *Bone.* 2000. V. 26. P. 227–234.
134. Adachi Y., Kas E., Laemmli U.K. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 3997–4006.
135. Kohwi-Shigematsu T., Kohwi Y., Takahashi K., Richards H.W., Ayers S.D., Han H.J., Cai S. // *Methods.* 2012. V. 58. P. 243–254.
136. Burute M., Gottimukkala K., Galande S. // *Immunol. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 852–859.
137. Naito T., Tanaka H., Naoe Y., Taniuchi I. // *Int. Immunol.* 2011. V. 23. P. 661–668.
138. Yasui D., Miyano M., Cai S., Varga-Weisz P., Kohwi-Shigematsu T. // *Nature.* 2002. V. 419. P. 641–645.
139. Hasegawa Y., Brockdorff V.N., Kawano S., Tsutsui K., Nakagawa S. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. P. 469–476.
140. Tattermusch A., Brockdorff N. // *Hum. Genet.* 2011. V. 130. P. 247–253.
141. Razin S.V., Iarovaia O.V., Vassetzky Y.S. // *Chromosoma.* 2014. V. 123. P. 217–224.
142. Harraghy N., Buceta M., Regamey A., Girod P.A., Mermod N. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 801. P. 93–110.
143. Zahn-Zabal M., Kobr M., Girod P.A., Imhof M., Chatellard P., de Jesus M. // *J. Biotech.* 2001. V. 87. P. 29–42.
144. Harraghy N., Regamey A., Girod P.-A., Mermod N. // *J. Biotechnol.* 2011. V. 154. P. 11–20.
145. Buceta M., Galbete J.L., Kostic C., Arsenijevic Y., Mermod N. // *Gene Therapy.* 2011. V. 18. P. 7–13.
146. Ley D., Harraghy N., Le Fourn V., Bire S., Girod P.A., Regamey A., Rouleux-Bonnin F., Bigot Y., Mermod N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e62784.
147. Grandjean M., Girod P.A., Calabrese D., Kostyrko K., Wicht M., Yerly F., Mazza C., Beckmann J.S., Martinet D., Mermod N. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. e104.
148. Puttini S., van Zwieten R.W., Saugy D., Lekka M., Hogger F., Ley D., Kulik A.J., Mermod N. // *BMC Mol. Biol.* 2013. V. 14. P. 26.
149. Shimizu N., Miura Y., Sakamoto Y., Tsutsui K. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 6987–6990.
150. Noguchi C., Araki Y., Miki D., Shimizu N. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e52990.
151. Antoniou M., Harland L., Mustoe T., Williams S., Holdstock J., Yague E., Mulcahy T., Griffiths M., Edwards S., Ioannou P.A., et al. // *Genomics.* 2003. V. 82. P. 269–279.
152. Williams S., Mustoe T., Mulcahy T., Griffiths M., Simpson D., Antoniou M., Irvine A., Mountain A., Crombie R. // *BMC Biotech.* 2005. V. 5. P. 17.
153. Benton T., Chen T., McEntee M., Fox B., King D., Crombie R., Thomas TC, Bebbington C. // *Cytotechnology.* 2002. V. 38. P. 43–46.
154. Zhang F., Thornhill S.I., Howe S.J., Ulaganathan M., Schambach A., Sinclair J., Kinnon C., Gaspar H.B., Antoniou M., Thrasher A.J. // *Blood.* 2007. V. 110. P. 1448–1457.
155. Zhang F., Frost A.R., Blundell M.P., Bales O., Antoniou M.N., Thrasher A.J. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. P. 1640–1649.
156. Dighe N., Khoury M., Mattar C., Chong M., Choolani M., Chen J., Antoniou M.N., Chan J.K. // *PLoS One.* 2014. V. 9. e104805.
157. Pfaff N., Lachmann N., Ackermann M., Kohlscheen S., Brendel C., Maetzig T., Niemann H., Antoniou M.N., Grez M., Schambach A., et al. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. P. 488–499.
158. Brendel C., Müller-Kuller U., Schultze-Strasser S., Stein S., Chen-Wichmann L., Krattenmacher A., Kunkel H., Dillmann A., Antoniou M.N., Grez M. // *Gene Ther.* 2012. V. 19. P. 1018–1029.
159. Boscolo S., Mion F., Licciulli M., Macor P., De Maso L., Brce M., Antoniou M.N., Marzari R., Santoro C., Sblattero D. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 29. P. 477–484.
160. Lindahl A.M., Antoniou M. // *Epigenetics.* 2007. V. 2. P. 227–236.
161. Nair A.R., Jinger X., Hermiston T.W. // *BMC Res. Notes.* 2011. V. 4. P. 178.
162. Jonuschies J., Antoniou M., Waddington S., Boldrin L., Muntoni F., Thrasher A., Morgan J. // *Curr. Gene Ther.* 2014. V. 14. P. 276–288.

163. Otte A.P., Kwaks T.H., van Blokland R.J., Sewalt R.G., Verhees J., Klaren V.N., Siersma T.K., Korse H.W., Teunissen N.C., Botschuijver S., et al. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. P. 801–807.
164. Hoeksema F., Hamer K., Siep M., Verhees J.A., Otte A.P. // *Biotechnol. Res. Int.* 2011. 492875.
165. Wang J., Lawry S.T., Cohen A.L., Jia S. // *Cell Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. P. 4841–4852.
166. Kwaks T.H.J., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R.G., Satijn D.P., Brons J.F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A.L., et al. // *Nat. Biotechnology.* 2003. V. 21. P. 553–558.
167. Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., et al. // *Genome Res.* 2012. V. 22. P. 2188–2198.

УДК 615.277.3, 577.214.39

Ингибиторы PARP1: разработка противоопухолевых препаратов

Н. В. Малюченко^{1*}, Е. Ю. Котова², О. И. Кулаева^{1,2}, М. П. Кирпичников¹, В. М. Студитский^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111-2497 USA

*E-mail: mal_nat@mail.ru; Vasily.Studitsky@fccc.edu

Поступила в редакцию 10.12.2014

РЕФЕРАТ Одной из перспективных молекулярных мишеней для поиска противоопухолевых средств является поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP1), распространенный ядерный белок (1–2 млн молекул на клетку), выполняющий функцию «сенсора» разрывов ДНК. Экспрессия PARP1 повышена при меланоме, раке легкого, молочной железы и других опухолевых заболеваниях. При этом повышенный уровень экспрессии считается прогностическим признаком, связанным с худшим прогнозом выживаемости. Есть данные, что высокая экспрессия PARP1 и устойчивость опухолей к терапии взаимосвязаны. Ингибиторы PARP1 рассматриваются в качестве перспективных противоопухолевых агентов, действующих как химио- и радиосенсибилизаторы при традиционной терапии злокачественных образований. Кроме того, ингибиторы PARP1 могут использоваться как самостоятельные лекарственные средства, эффективные при опухолях, в которых нарушены определенные пути репарации ДНК. В настоящее время получены ингибиторы PARP1 уже третьего поколения, многие из которых проходят клинические испытания второй фазы. В настоящем обзоре рассмотрены свойства и характеристики ингибиторов PARP1, выявленные в доклинических и клинических исследованиях, а также некоторые проблемы, связанные с применением ингибиторов PARP1. Обсуждается возможность создания новых ингибиторов PARP1, направленных не на каталитический домен, а на подавление ДНК-связывающей и транскрипционной активности данного белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ингибиторы PARP1, поли(ADP-рибозо)полимераза 1, противоопухолевые средства.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PARP1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; BER – эксцизионная репарация оснований; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; MMR – репарация мисматчей; HR – репарация двухцепочечных разрывов с помощью гомологичной рекомбинации; NHEJ – репарация негомологичного присоединения концов; SSB – односторонние разрывы ДНК; DSB – двухцепочечные разрывы; TMZ – темозоломид; Торо I – топоизомераза 1; КИ – клинические испытания/исследования; PLD – потенциально летальное повреждение.

ВВЕДЕНИЕ

В основе поиска и получения современных лекарственных средств лежит нацеленность на молекулярную мишень. Одна из мишеней, используемых при разработке противоопухолевых препаратов, – фермент поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP1), участвующий во многих клеточных процессах, начиная от репарации ДНК до гибели клеток [1]. Недавно показали, что одним из самых ранних событий, происходящих при повреждениях ДНК, является узнавание ферментом PARP1 разрывов ДНК. При возникновении разрывов ДНК, вызванных, в частности, алкилирующими агентами и радиацией, PARP1 связывается с местами разрывов за счет так называемых «цинковых пальцев», расположенных в ДНК-связывающем домене, и одновременно син-

тезирует олиго- или поли(ADP)-рибозные цепочки, ковалентно связываемые с разными акцепторными белками или с собственной молекулой путем перемещения единицы ADP-рибозы от NAD⁺. В результате в месте разрыва происходит деконденсация хроматина, что облегчает доступ ферментов репарации. Модифицированные поли(ADP-рибозил)ированные белки хроматина привлекают факторы, ремоделирующие хроматин. Один из ключевых механизмов PARP1-зависимой деконденсации заключается в том, что активированный PARP1 способствует удалению линкерного гистона H1 из сайтов инициации транскрипции. При удалении H1 происходит деконденсация хроматина, что позволяет ферментам репарации атаковать поврежденные сайты в ДНК. Следует отметить, что репарация ДНК при актив-

ном участии PARP1 происходит лишь при минимальном генотоксическом повреждении. При более сильном повреждении запускается процесс апоптоза, а при обширном повреждении ДНК наблюдается сверхактивация PARP, приводящая к некрозу.

Получено множество данных об участии PARP1 в канцерогенезе. Потеря PARP1 приводит к нарушениям процесса репарации ДНК, ингибированию транскрипции некоторых генов, вовлеченных в репликацию ДНК, регуляцию клеточного цикла. Пониженная экспрессия PARP1 приводит к возникновению перестановок в геноме, дефектам в хромосомах и, возможно, вносит вклад в общую нестабильность генома. В то же время повышенная экспрессия PARP1 наблюдается в меланомах, опухолях легкого и молочной железы [2–7]. При этом повышенный уровень экспрессии рассматривается как прогностический признак, связанный с худшим прогнозом выживаемости [8]. Было показано, что высокий уровень экспрессии PARP1 коррелирует с более агрессивным фенотипом злокачественных опухолей молочной железы (PMЖ) (эстрогеннегативный тип PMЖ) [9]. Экспрессия PARP1 может коррелировать с устойчивостью опухолей к терапии [10]. Подобная более высокая «злокачественность» связана, видимо, с тем, что повышенная экспрессия PARP1 способствует репарации повреждений ДНК и тем самым преодолению генетической нестабильности, свойственной трансформированным клеткам.

Механизмы проопухолевой активности PARP1 разнообразны, в ряде случаев они опосредуются различными опухоль-ассоциированными факторами транскрипции. Канцерогенез может быть вызван PARP1-зависимой дерегуляцией факторов, вовлеченных в клеточный цикл, митоз, а также факторов, регулирующих экспрессию генов, связанных с инициацией и развитием опухолей [11]. Выявлена связь между PARP1 и фактором NF-κB. Оказалось, что PARP1 корегулирует активность NF-κB и приводит к увеличению секреции прометастатических цитокинов. Известно, что сигнальный каскад NF-κB важен для опухолевого роста [12]. Ингибирование PARP1 приводит к отмене проинвазивного фенотипа [13, 14]. Известно также, что PARP1 контролирует экспрессию белка теплового шока 70 (HSP70) [15, 16], который вносит существенный вклад в выживание опухолевых клеток и их устойчивость к противоопухолевым средствам [17]. PARP1 взаимодействует с белком p21, контролирующим клеточный цикл, что также может способствовать развитию опухолевого фенотипа [18]. Белок p21 взаимодействует непосредственно с PARP1 в процессе репарации ДНК, и нокаун p21 приводит к увеличению ферментативной активности PARP1. Экспрессия p21 в опу-

холях часто подавлена благодаря регуляции p53 [19], что может объяснять возможную роль PARP1 в канцерогенезе. Обнаружено также, что PARP1 участвует в гормонзависимой регуляции канцерогенеза. В клетках рака предстательной железы, экспрессирующих рецептор андрогенов (AR), PARP1 рекрутируется в сайты локализации AR и стимулирует активность AR [20]. Сходные хроматинзависимые механизмы с участием PARP1 вовлечены в эстрогензависимую регуляцию экспрессии генов при PMЖ.

Поскольку PARP1 – это ключевой фермент, регулирующий определенные канцерогенные изменения в клетке, он рассматривается как важная молекулярная мишень для разрабатываемых противоопухолевых средств, а ингибиторы PARP1 считаются перспективными противоопухолевыми средствами.

ИСТОРИЯ РАЗРАБОТКИ ИНГИБИТОРОВ PARP1

Поскольку эффект лучевой терапии и многих химиотерапевтических подходов при онкологических заболеваниях определяется повреждением ДНК, ингибиторы PARP1 могут применяться для усиления традиционных методов и действовать как химио- и радиосенсибилизаторы. В клетках, обработанных противоопухолевыми агентами, ингибирование PARP1 подавляет репарацию потенциально летального повреждения и может приводить к уничтожению аномальной клетки. Подобным образом в ряде случаев ингибиторы PARP1 повышают эффективность действия ДНК-алкилирующих агентов (например, темозоламида) и ингибиторов топоизомеразы I (например, топотекана), а также ионизирующего излучения. Ингибиторы PARP1 также эффективны в радиосенсибилизации опухолевых клеток. Помимо синергичного действия ингибиторов PARP1 и других ДНК-повреждающих противоопухолевых средств, в некоторых опухолевых клетках наблюдается прямое токсическое действие ингибиторов PARP1.

Первое поколение классических ингибиторов PARP1 – аналогов никотинамида – было создано около 30 лет назад, исходя из наблюдений, что никотинамид, второй продукт катализируемой PARP1 реакции, вызывает умеренное ингибирование реакции (рис. 1). В ингибиторах PARP1 первого поколения гетероциклический атом азота в третьем положении был заменен на атом углерода, что привело к созданию класса бензамидных аналогов [21]. Замена в третьем положении привела к улучшению растворимости препаратов (рис. 2). Изучение активности 3-замещенных бензамидов (например, 3-аминобензамида, 3-AB) помогло лучше понять функцию PARP1. Оказалось, что такие препараты обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки при одновременном использовании агентов, вызывающих генотоксиче-

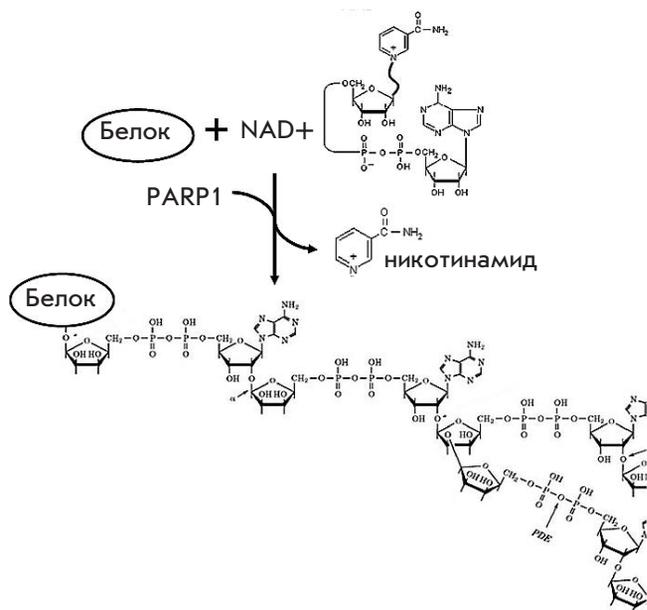


Рис. 1. Схема реакции поли(АДП)-рибозилирования белков

ский стресс [22]. Несмотря на обнадеживающие результаты изучения ингибиторов PARP1 первого поколения, в практическом отношении бензамиды были малоэффективными. В доклинических экспериментах на культуре клеток их приходилось использовать в миллимолярных концентрациях, что делало их непригодными для экспериментов на животных. Кроме того, бензамиды ингибировали другие клеточные пути [23]. Тем не менее они легли в основу создания более эффективных препаратов. Практически все используемые до сих пор ингибиторы PARP1 содержат никотинамидную/бензамидную фармакоформную группу.

В 1990 годы на основе аналогов хиназолина (в частности, 1,5-дигидроизохинолина) были разработаны более эффективные ингибиторы PARP1 второго поколения. Эта группа соединений включала изохинолины, хиназолиндионы, фталазионы и фенантридионы. Ингибиторы PARP1 второго поколения были более эффективными и точнее

нацеленными на терапевтические мишени [24]. Некоторые из этих соединений стали основой для последующей разработки различных групп лекарственных средств (рис. 3). В частности, получение фенантридионов привело к разработке PJ-34, который использовали в дальнейшем в клинических испытаниях (КИ) [25]. Альтернативный подход (химический синтез на основе анализа структуры и активности, SAR) привел к идентификации 3,4-дигидро-5-метилизохинолина-1-[2Н]-1 (PD128763) и 8-гидрокси-2-метилхиназолина-4-[3Н]-он (NU1025). Каждое из этих соединений в ~50 раз более эффективно ингибирует PARP1, чем 3-АВ.

В дальнейшем более сильные ингибиторы разрабатывали по аналогии с уже известными. Все они содержали карбоксамидную группу бензамидного фармакофора, включенную во второе ароматическое кольцо. Именно эта модификация имела решающее значение для повышения активности ингибиторов. Причины, объясняющие связь этих структурных особенностей с увеличением активности, стали очевидными после изучения структуры. Кристаллизация ингибиторов PARP1 показала, что карбоксамидная группа формирует несколько важных водородных связей с Ser904-OG и Gly863-N в каталитическом домене PARP1, что улучшает взаимодействие гетероцикла данных ингибиторов с белком [26]. При этом у более эффективных ингибиторов (PD128763, 4ANI, и NU1025) амидная группа в гетероцикле зафиксирована. Выявлена также важность ароматических (π-π)-взаимодействий между фенольной группой ингибиторов PARP1 и фенольной группой Tyr907 белка PARP1. На основании структурного анализа связывания NU1085 разработано несколько трициклических лактамных индолов и бензамидазолов, в которых карбоксамидная группа была введена в благоприятной ориентации путем включения в 7-членное кольцо [27–30]. Эти соединения, например, AG14361, способны образовывать критические водородные связи с Gly863 и Ser904, Glu988 белка PARP1 [31].

Дальнейший поиск привел к созданию более сильных ингибиторов PARP третьего поколения, первым охарактеризованным представителем которых

Рис. 2. Ингибитор PARP1 первого поколения – 3-аминобензамид (3-АВ). Красным обозначена никотинамидная фармакоформная группа

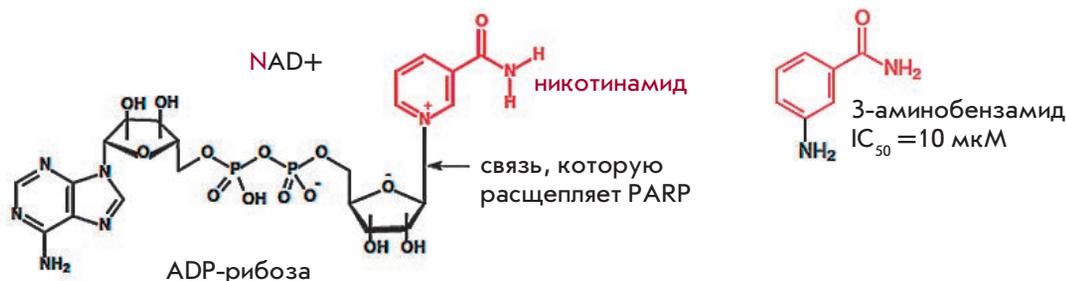
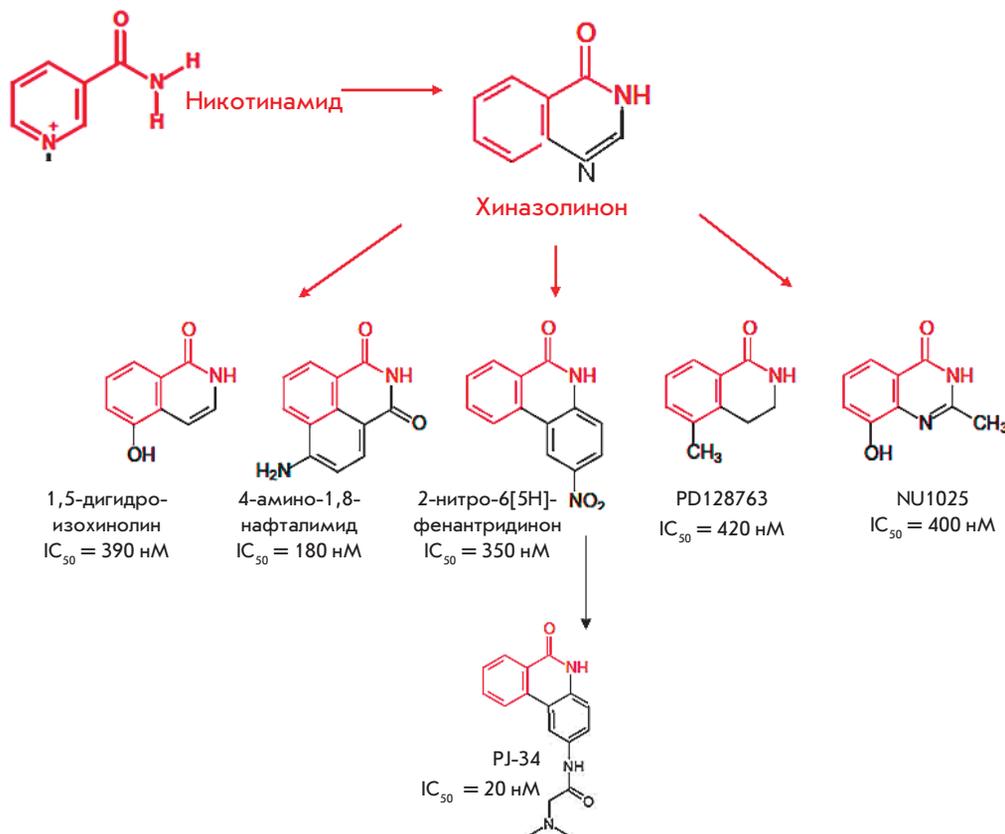


Рис. 3. Ингибиторы второго поколения. Красным обозначена никотинамидная фармакоформная группа



стал рукапариб ($K_i = 1.4$ нМ) [32]. В настоящее время на основе бензамидазолов синтезирован ряд ингибиторов PARP1 третьего поколения; многие из которых (такие, как рукапариб, инипариб, олапариб, велипариб, нирапариб, талазопариб, CEP-9722 и E7016) в настоящий момент проходят клинические испытания (см. обзоры [33–38], рис. 4, таблица).

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ PARP1: ПРЯМОЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ

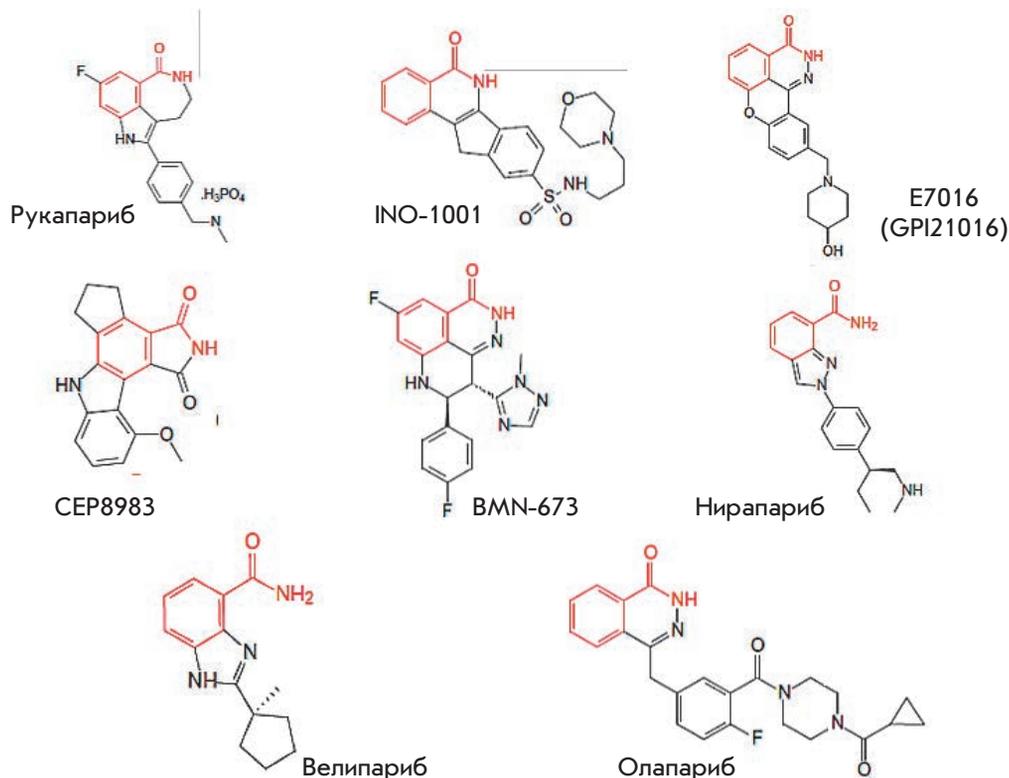
Ингибирование PARP1 приводит к нарушению репарации ДНК. Известно, что в ответ на повреждение ДНК PARP1 связывается с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК [39]. В отсутствие повреждений активность PARP1 минимальна, однако появление повреждений вызывает его немедленную и значительную (до 500-кратной) активацию. PARP1 отыскивает разрывы в ДНК, действуя как сенсор и обеспечивая быстрое привлечение белков, требуемых для репарации, к месту повреждения. PARP1 контролирует несколько путей репарации ДНК, в том числе эксцизионную репарацию оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), репарацию мисматчей (mismatch repair, MMR), репарацию двухцепочечных разрывов с помощью гомологичной рекомбинации (HR) и с помощью негомологич-

ного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) [39].

Ингибирование PARP приводит к инактивации системы репарации и сохранению спонтанных одноцепочечных разрывов (SSB) (рис. 5A), что может быть причиной последующего формирования двухцепочечных разрывов ДНК (DSB). DSB можно устранить двумя способами – либо «репарацией ДНК без ошибок» с помощью HR, либо репарацией с возможностью замены в последовательности нуклеотидов путем NHEJ [40, 41]. В ряде опухолевых клеток с нарушениями в системе гомологичной рекомбинации (например, BRCA-мутантные клетки) может включаться система NHEJ, однако использование NHEJ в этих опухолях приводит к дестабилизации генома и, в конечном итоге, к гибели клеток из-за быстрого накопления генетических ошибок [42–44].

В 2005 году произошел прорыв в области исследований ингибиторов PARP1. Двумя независимыми группами ученых было показано, что BRCA1- и BRCA2-дефицитные линии клеток чувствительны к прямому действию ингибиторов PARP. Это были первые свидетельства того, что ингибиторы PARP1 могут выступать как самостоятельные лекарственные средства в случае опухолей, в которых нарушены определенные пути репарации ДНК [45, 46].

Рис. 4. Структура ингибиторов PARP1 третьего поколения. Красным обозначена никотинамидная фармакоформная группа



Известно, что опухоль-ассоциированный ген *BRCA1* играет важную роль в репарации двойных разрывов ДНК по механизму HR. Клетки с дефицитом *BRCA1* характеризуются менее эффективной HR, и репарация ДНК в них происходит преимущественно с помощью системы BER. *BRCA2* взаимодействует с белком *RAD51* и также играет существенную роль в HR. Клетки с мутациями в области связывания *BRCA2* с *RAD51* проявляют гиперчувствительность к повреждениям ДНК и хромосомную нестабильность [47]. Например, 10–15% серозного рака яичников имеет наследственный характер, обусловленный мутацией в генах *BRCA1* или *BRCA2*. Показано, что дефекты в HR-репарации, возникающие вследствие мутаций в *RAD51*, *DSS1*, *RPA1* или *CHK1*, вызывают повышенную чувствительность клеток к ингибированию PARP1 [48]. Ингибирование репарации повреждений ДНК при условии дефицита гомологичной рекомбинации приводит клетку к гибели из-за невозможности исправить все повреждения ДНК.

Объяснить прямое действие ингибиторов PARP1 на опухолевые клетки можно также с помощью другого механизма. Предполагается, что в результате действия ингибиторов PARP1 остается связанным с поврежденной ДНК, поэтому он не может отделиться от ДНК и «освободить» место для PARP1-зависимых ферментов репарации (рис. 5Б).

Третья модель прямого действия ингибиторов PARP1 основана на наблюдении Li и Yu [49], которые показали, что в присутствии ингибиторов PARP1 мутантный *BRCA1* в меньшей степени накапливается в области повреждений ДНК (рис. 5В).

Предложена также четвертая модель прямого действия ингибиторов PARP1 (рис. 5Г). Согласно этой модели, при двухцепочечных разрывах в клетках с дефицитом HR активируется другая система NHEJ [44]. Ключевые белки этой системы – *Ku70*, *Ku80* и *DNA-РКс*, как показано ранее, имеют PARP1-связывающие мотивы и могут регулироваться с помощью ADP-рибозилирования [50, 51].

В клинических исследованиях монотерапия олапарибом приводила к ингибированию опухолей с мутациями в *BRCA1* или *BRCA2* (рак молочной железы и рак яичников) [52, 53]. При этом клетки с дефицитом *BRCA1* или *BRCA2* были в 57 или 133 раза более чувствительны к ингибированию PARP1 соответственно [46]. Однако эффективность подобной терапии была невысокой – положительный ответ наблюдался менее чем у 50% пациентов [54]. Поэтому очень важно правильно определить прогностические маркеры терапии ингибиторами PARP1. Такими маркерами могут быть мутации в генах *53BP1*, *RAD51*, *NBS1*, *ATM*, *ATR*, *Chk1*, *Chk2*, *Rad54*, *FANCD2*, *FANCA*, *PALB2*, *FANCC*, *PTEN* [39, 55–59].

Таблица. Клинические испытания ингибиторов PARP1. Взято из обзоров [42, 43]

| Название | Терапия | Опухоли | Фаза КИ |
|--------------------|-------------------------------|--|---------|
| Рукапариб AG014699 | Монотерапия | BRCA мутантный рак легких, рак яичников | 2 |
| Рукапариб | + темозоломид | Солидные опухоли, меланома | 2 |
| Рукапариб | +карбоплатин | Солидные опухоли | 1 |
| Олапариб | Монотерапия | Солидные опухоли, носители BRCA, TNBC/ HGSOС | 2 |
| Олапариб | + топотекан | Солидные опухоли | 1 |
| Олапариб | + дакарбазин | Солидные опухоли | 1 |
| Олапариб | +бевасизумаб | Солидные опухоли | 1 |
| Олапариб | + паклитаксел | Рак яичников | 2 |
| Олапариб | + паклитаксел | Рак желудка | 2 |
| Олапариб | +цисплатин | Солидные опухоли | 1 |
| Велипариб АВТ-888 | Монотерапия | Солидные опухоли | 1 |
| Велипариб | + топотекан | Солидные опухоли | 1 |
| Велипариб | +карбоплатин | Солидные опухоли | 1 |
| Велипариб | +темозоломид | Солидные опухоли, опухоли печени, рак простаты | 2 |
| Велипариб | +циклофосфамид | Солидные опухоли и лимфомы | 2 |
| INO-1001 | +темозоломид | Меланома | 1 |
| МК4827 | Монотерапия | Солидные опухоли и лимфомы | 2 |
| МК4827 | +темозоломид | Рак яичников/glioblastoma | 1 |
| МК4827 | +доксорибуцин | Рак яичников/glioblastoma | 1 |
| СЕР-9722 | Монотерапия | Солидные опухоли | 1 |
| СЕР-9722 | +темозоломид | Лимфомы | 1 |
| BMN-673 | Монотерапия | Солидные опухоли | 1 |
| Инипариб (BSI-201) | + гемцитабин + карбоплатин | мТНРМЖ | 2 |
| Инипариб | + гемцитабин + цисплатин | Рак легкого | 2 |
| Инипариб | + гемцитабин + карбоплатин | мТНРМЖ | 3 |

Терминальные мутации генов *BRCA1* или *BRCA2* в опухолевых клетках приводят к появлению дефектов в системе гомологичной рекомбинации ДНК, в работе которой в норме принимают участие оба белка *BRCA*. В этом случае опухолевые клетки становятся чрезвычайно зависимыми от одной из пяти других систем репарации, в работе каждой из которых участвует PARP1. Ингибирование PARP1 при условии дефицита гомологичной рекомбинации ведет клетку к апоптозу из-за невозможности репарации всех возникших повреждений ДНК. Этот процесс назван «синтетической летальностью». В ряде работ показана перспективность применения ингибиторов PARP1 у больных с опухолями, возникшими из-за дефектов в генах *BRCA*.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ PARP1: СИНЕРГИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Ингибиторы PARP1 не всегда оказывают прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки.

В таких случаях желаемый эффект может быть достигнут при совместном использовании ингибиторов PARP1 и других препаратов, вызывающих повреждение ДНК.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 И АГЕНТОВ, МЕТИЛИРУЮЩИХ ДНК

Еще в 80-х годах прошлого столетия на примере 3-AB было показано, что ингибиторы PARP усиливают действие агентов, метилирующих ДНК [22]. ДНК-метилирующие агенты, такие, как дакарбазин (DTIC), темозоломид (TMZ), активно используются в настоящее время в терапии опухолей головного мозга и меланомы. Эти препараты способны метилировать ДНК в положениях O⁶ и N⁷ гуанина и N³ аденина. Удаление N-метилпуринов (N⁷-MEG и N³-MEA) приводит к появлению SSB, а ингибирование PARP1 инактивирует репарацию таких повреждений [60]. В ранних исследованиях показали, что PD128763 и NU1025 усиливают индуцированные TMZ по-

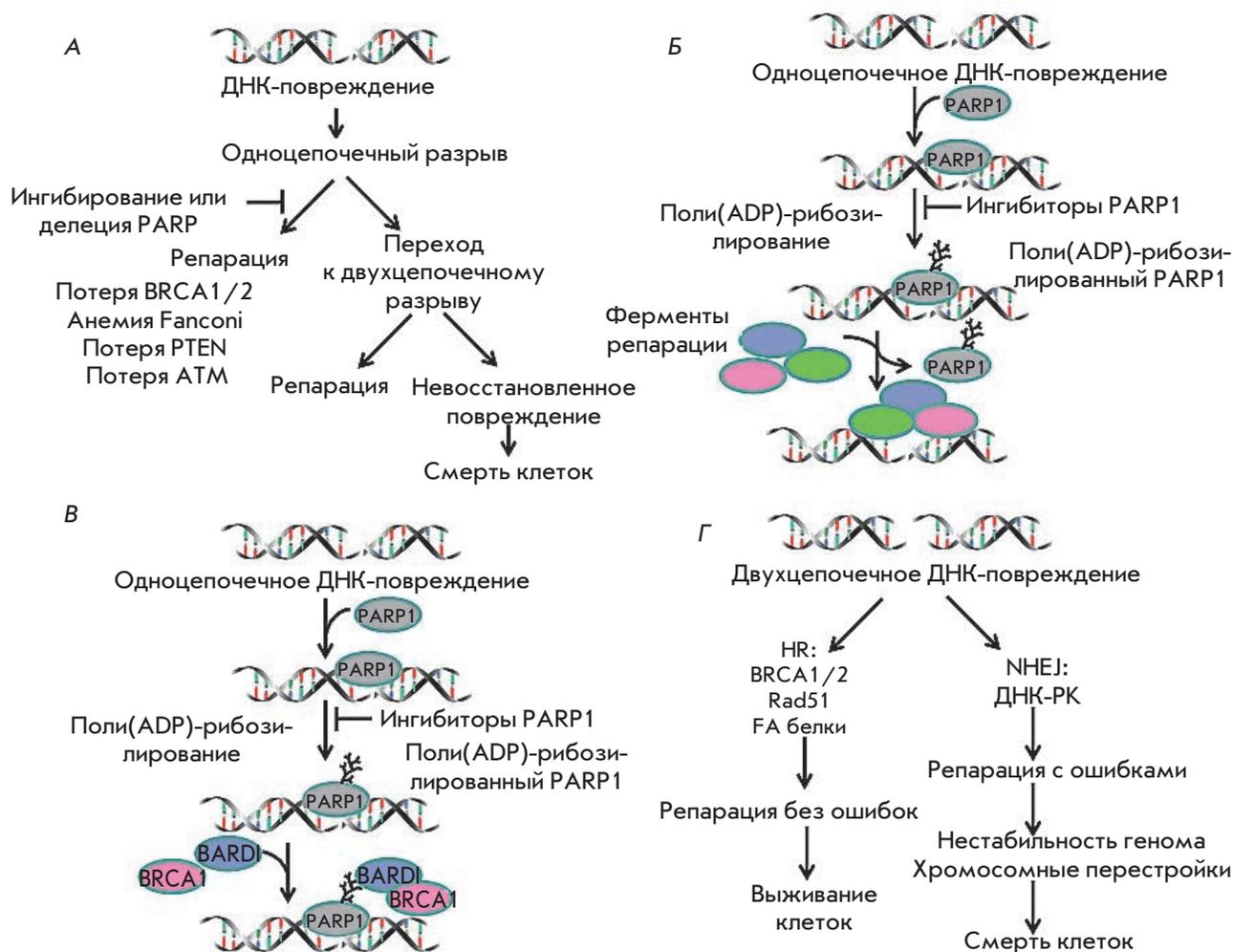


Рис. 5. Прямое цитотоксическое действие ингибиторов PARP1. **А** – ингибирование PARP1 приводит к инактивации системы репарации и сохранению спонтанно возникающих одноцепочечных разрывов (SSB), что приводит к формированию двухцепочечных разрывов. **Б** – в результате действия ингибиторов PARP1 остается связанным с поврежденной ДНК и, таким образом, не может отойти от ДНК и освободить место для действия репарационных PARP1-зависимых ферментов. **В** – в присутствии ингибиторов PARP1 мутантный BRCA1 в меньшей степени накапливается в области повреждений ДНК, **Г** – при двухцепочечных разрывах в HR-дефицитных клетках активируется другая система NHEJ, репарация проходит с ошибками, что может привести к геномной нестабильности и гибели клеток

вреждения ДНК и увеличивают цитотоксичность TMZ в 4–7 раз при его использовании в более низких концентрациях (в 50–100 раз) [61]. Повышение эффективности TMZ (до 6 раз) в присутствии NU1085 наблюдали на 12 различных линиях опухолей человека независимо от их тканевого происхождения и статуса p53 [62]. Серия бензимидазолов и трициклических лактамных индолов, в том числе AG14361 в концентрации только 0.4 мкМ, в 5.3 раза усиливает индуцированное TMZ ингибирование роста клеток LoVo (рак толстой кишки человека) [30]. Подобное синергичное действие ингибиторов PARP и Торо I на-

блюдали во множестве работ, выполненных *in vitro*. Следует подчеркнуть, что ингибиторы PARP1, как установлено, усиливают цитотоксичность TMZ преимущественно в S-фазе, что указывает на механизм синергичного действия: скорее всего, ингибиторы вызывали накопление DSB в процессе репликации [63, 64]. Усиление противоопухолевой активности TMZ в присутствии различных ингибиторов PARP *in vivo* показано во многих экспериментах. Приведем некоторые примеры. Совместная обработка NU1025 и TMZ повышает выживаемость мышей с лимфомами головного мозга [65]. Ингибитор GPI 15427 увели-

чивает индуцированную TMZ задержку роста опухоли и антиметастатическую активность в модели меланомы B16 [66]. Велипариб усиливает активность TMZ в подкожных, ортотопных и метастатических моделях ксенотрансплантатов человека, включая лимфомы, рак яичников, легкого, поджелудочной, молочной и предстательной железы [67]. Интересно, что и GPI 15427 и велипариб преодолевают гематоэнцефалический барьер и усиливают противоопухолевую активность TMZ у мышей с внутречерепными меланомами, глиомами и лимфомами [68]. В моделях детских опухолей рукапариб усиливает противоопухолевую активность TMZ в ксенотрансплантатах нейробластомы и медуллобластомы [69]. Полную регрессию опухоли при обработке TMZ и CEP-6800 наблюдали у мышей, несущих ксенотрансплантаты U251MG (глиобластома человека) [70] и SW620 (рак толстой кишки человека) [32, 71]. Эти и другие данные, полученные в испытаниях *in vivo*, позволили положить начало клиническим испытаниям ингибиторов PARP вместе с ДНК-метилирующими агентами (таблица).

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 И ИНГИБИТОРОВ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I (ТОРО I)

Известно, что активность Торо I повышена в некоторых опухолях [72]. Ингибиторы Торо I применяют при различных формах опухолей, например, топотекан – при мелкоклеточном раке легкого, раке яичников и шейки матки, иринотекан – при раке толстой кишки. Торо I вносит временные повреждения в ДНК для устранения напряжений, накапливающихся в ДНК в ходе транскрипции и репликации. Ингибиторы Торо I, такие, как камптотецины, стабилизируют расщепляемый комплекс Торо I–

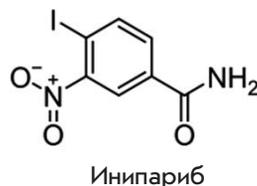


Рис. 6. Структура инипариба

ДНК на стадии, когда происходят разрывы ДНК. Репарация повреждений, вызываемых Торо I, происходит с участием BER/SSB. При этом клетки, лишённые ключевого белка BER – XRCC1, гиперчувствительны к камптотецину. Ферменты PARP, как полагают, участвуют в этом процессе, привлекая XRCC1 к Торо I-зависимым разрывам ДНК [73], которые, в свою очередь, привлекают тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу (TDP 1), удаляющую Торо I с ДНК [74]. Кроме того, PARP1 способен взаимодействовать с Торо I и репарировать Торо I-зависимые SSB [75]. В ряде работ показано усиление действия ингибиторов топоизомеразы I в присутствии ингибиторов PARP [30, 32, 71]. Приведем некоторые примеры. В 1987 году Mattern M.R. и соавт. первыми использовали ингибиторы PARP в качестве потенциальных усилителей ингибиторов Торо I. Они показали, что 3-AB увеличивает цитотоксичность камптотецина в клетках L1210 [76]. В дальнейшем синергичное действие ингибиторов Торо I и PARP1 активно изучалось. На 12 клеточных опухолевых линиях человека показано, что NU1025 и NU1085 повышают цитотоксичность топотекана независимо от тканевого происхождения этих линий и статуса p53 [62]. CEP-6800 и GPI 15427 повышали чувствительность к химиотерапевтическим препаратам – ингибиторам Торо I, в клеточных линиях рака толстой кишки [70,

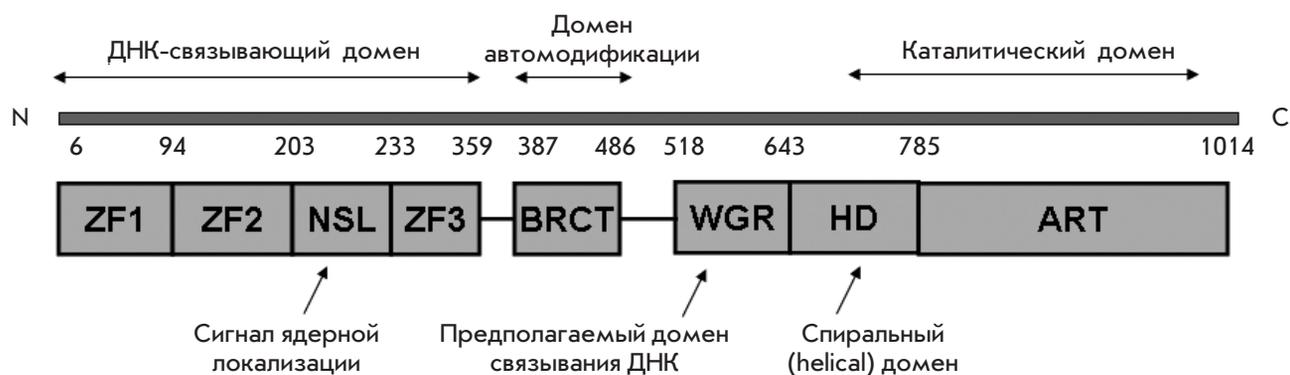


Рис. 7. Структурно-функциональная организация PARP1. В структуре PARP1 выделяют три основных функциональных домена: N-концевой ДНК-связывающий, внутренний домен автомодификации и C-концевой каталитический [108, 109], а также дополнительные функциональные области

77]. Обнадёживающие результаты получены также в опытах *in vivo*, в которых изучали совместное действие ингибиторов PARP и Торо I. CEP-6800 на 60% повышал иринотекан-зависимое ингибирование опухолей у мышей, несущих ксенотрансплантаты HT29 [70], а олапариб увеличивал токсичность топотекана, так что его дозу можно было уменьшить в 8 раз [78]. Эти и другие результаты опытов *in vivo* позволили положить начало клиническим испытаниям совместного применения ингибиторов PARP и Торо I (*таблица*).

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Ионизирующее излучение вызывает множество повреждений ДНК, модификацию оснований, SSB и DSB, при этом последние поражения считаются наиболее цитотоксическими. Сенсibilизация клеток, обработанных ингибиторами PARP, к ионизирующему излучению менее значительна, чем сенсibilизация к химическим соединениям, и, как правило, увеличивает цитотоксичность менее чем в 2 раза. Однако, учитывая, что большое число больных подвергаются лучевой терапии, такая комбинация может быть оправданной. Ранние исследования показали, что ингибирование PARP приводит к радиосенсibilизации клеток млекопитающих [79]. В дальнейшем показали, что различные ингибиторы PARP (ANI, NU1025, олапариб, E7016) повышали эффективность радиосенсibilизации разных линий клеток в 1.3–1.7 раза [80]. В некоторых исследованиях ингибиторы PARP селективно вызывали радиосенсibilизацию активно реплицирующихся клеток, находящихся в S-фазе [24]. Это позволило предложить механизм, с помощью которого ингибирование PARP увеличивает чувствительность к ионизирующему излучению. Ингибирование предотвращает репарацию SSB, преобразуя их в DSB при прохождении вилки репликации в S-фазе [81]. Такая гипотеза подтверждается наблюдением, согласно которому ингибирование PARP приводит к образованию дополнительных фокусов γ H2AX и RAD51 (что свидетельствует о повышенной частоте HRR, гомологичной рекомбинации в остановленной вилке репликации). Фактором, предрасполагающим к устойчивости к радиации *in vivo*, является способность клеток восстанавливаться после потенциально летального повреждения (PLD). При этом всегда есть вероятность сохранения радиорезистентных опухолевых клеток, которые могут вновь создать опухоль после лучевой терапии [82]. Показано, что ингибиторы PARP1, такие, как PD128763, NU1025, AG14361, предотвращали восстановление опухолевых клеток после PLD [63]. В ряде работ обнаружена эффектив-

ность радиосенсibilизации ингибиторами PARP1 *in vivo*. У мышей, несущих SCC7, RIF-1 и КНТ саркомы, ингибитор PD128763 вызвал трехкратное повышение терапевтической активности рентгеновских лучей [83]. Доклинические исследования показали, что велипариб значительно увеличивает противоопухолевую активность ионизирующего излучения в ксенотрансплантатных моделях рака толстой кишки, легкого и предстательной железы человека [68, 84, 85].

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 В СОЧЕТАНИИ С ДРУГИМИ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Некоторые данные свидетельствуют о способности ингибиторов PARP усиливать действие других противоопухолевых цитотоксинов. Например, 6(5H)-фенантридинон усиливает цитотоксичность кармустина в лимфоме мышей [86]. PJ-34 увеличивает цитотоксичность доксорубина в клетках HeLa, предположительно, за счет повышения уровня топоизомеразы II [87]. Сходное с ним соединение INO-1001 увеличивает противоопухолевую активность доксорубина на ксенотрансплантатах MDA-MB-231 и MCA-K клеток рака легкого [88]. Сообщения о синергическом действии ингибиторов PARP и соединений платины, таких, как цисплатин и карбоплатин, противоречивы. Тем не менее в ряде исследований показано, что PARP1 активируется индуцированными цисплатином повреждениями ДНК [89], что привело к проведению клинических испытаний ингибиторов PARP совместно с производными цисплатина (*таблица*).

ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ИНГИБИТОРОВ PARP1 И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА НОВЫХ

Практически все существующие ингибиторы PARP1 являются миметиками никотинамида, т.е. ориентированы на связывание с каталитическим доменом PARP1 и конкуренцию с NAD⁺. В опытах *in vitro*, а также во множестве доклинических и некоторых клинических испытаниях ингибиторы PARP1 достаточно хорошо зарекомендовали себя как противоопухолевые средства. Однако при проведении более систематических, контролируемых, расширенных клинических испытаний ингибиторов PARP1 вскрылся целый ряд проблем. Во-первых, соединения, ингибирующие связывание NAD⁺, имеют довольно низкую специфичность к PARP1, а также блокируют другие ферментативные пути с участием NAD⁺. Следует отметить, что NAD⁺ это кофактор, который взаимодействует со многими ферментами, вовлеченными в ряд клеточных процессов, поэтому конкуренция с NAD⁺ приводит к высокой токсично-

сти. Во-вторых, ферментативные ингибиторы PARP1 активируют репликацию вирусов и противопоказаны больным, инфицированным такими вирусами, как вирус Т-клеточного лейкоза человека (HTLV) или вирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV) [90–92]. В-третьих, вопрос о безопасности длительного применения существующих ингибиторов PARP1 остается открытым. Известно, что опухолевые клетки обладают способностью быстро приобретать устойчивость к препаратам, применяемым в качестве длительной монотерапии [93]. Эти проблемы стали причиной того, что многие ингибиторы PARP1 не прошли длительные систематические клинические испытания. Испытания некоторых ингибиторов PARP1 прекращены уже на I и II стадиях из-за высокой токсичности и ряда побочных эффектов. Показательной в этом отношении является история инипариба (BSI-201), который дальше всех других ингибиторов PARP1 продвинулся в разработке и дошел до рандомизированного клинического испытания фазы III.

Клиническое исследование фазы III препарата BSI-201 (инипариба) началось в июле 2009 года для оценки эффективности применения этого препарата в комбинации с химиотерапией, проводимой у пациенток с метастатическим трижды негативным раком молочной железы (мТНРМЖ). В исследовании приняли участие 519 женщин с мТНРМЖ из 109 центров в США. А уже в 2013 году фирма «Санofi-авентис» объявила о прекращении клинических испытаний, поскольку не наблюдалось улучшения состояния и общей выживаемости пациенток, получавших инипариб и химиотерапию, по сравнению с контрольной группой (только химиотерапия). Ряд обстоятельств привел к неудаче клинических испытаний инипариба. Основная причина неудачи заключалась в том, что к моменту набора групп для клинических исследований доклинические эксперименты были проведены не в полном объеме; было получено очень мало сведений о механизме действия инипариба. Инипариб был допущен к КИ первой фазы еще до получения результатов доклинических испытаний [94, 95]. Здесь интересно еще одно обстоятельство: фирма Virag, которая разрабатывала инипариб и продала свои разработки фирме «Санofi», так и не раскрыла структуру данного соединения из-за патентных соображений. Позднее оказалось, что, в отличие от всех других ингибиторов PARP1, имеющих сходную структуру, только инипариб имел подвижную карбоксильную группу, которая могла вращаться вокруг амидной связи, что в значительной

степени ослабляло связывание ингибитора с PARP1 (рис. 6). Как признался один из экспертов «Санofi»: «Если бы Virag предоставил структуру инипариба, то, вероятно, мы смогли бы предположить, что он не будет хорошим ингибитором PARP1». Тем не менее, несмотря на отсутствие достаточного описания препарата (известной структуры и фармакодинамических данных), фирма допустила его до клинических исследований, в результате неудачи которых издержки компании «Санofi-авентис» составили 285 млн долларов.

Достаточно высокая токсичность и ряд побочных эффектов, вызываемых ферментативными ингибиторами PARP1 и выявляемых в КИ, заставляют менять стратегию разработки новых ингибиторов PARP1. Поскольку PARP1 состоит из нескольких функциональных доменов и обладает дополнительными активностями, помимо ферментативной, в частности ДНК-связывающей и транскрипционной (рис. 7), активность PARP1 можно регулировать ингибированием данных функциональных доменов. В частности, разрабатываются препараты, направленные на ингибирование связывания PARP1 с ДНК [96]. По мнению авторов, поиск соединений, способных предотвращать участие PARP1 в процессе транскрипции, может привести к разработке нового класса лекарственных средств, имеющих более высокую специфичность и менее выраженные побочные эффекты. Более подробно о роли PARP1 в регуляции транскрипции можно ознакомиться в работах [97–101]. Используя полученную ранее авторами систему транскрипции в моно- и полинуклеосомных системах, становится возможным провести поиск и проверку транскрипционных ингибиторов PARP1.

В заключение следует отметить, что ингибиторы PARP1 представляют большой интерес и имеют практическую ценность не только в онкологии, но и в терапии различных воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, а также заболеваний, связанных со старением. Терапевтический эффект ингибиторов PARP в данных процессах остался за рамками настоящего обзора (для ознакомления см. обзоры [102–109]). ●

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение Минобрнауки России № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kraus W.L., Hottiger M.O. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 1109–1123.
2. Rodríguez M.I., Peralta-Leal A., O'Valle F., Rodríguez-Vargas J.M., Gonzalez-Flores A., Majuelos-Melguizo J., López L., Serrano S., de Herreros A.G., Rodríguez-Manzanique J.C., et al. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 6. P. e1003531.
3. Newshean S., Cooper T., Stanley J.A., Yang E.S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. P. e46614.
4. Galia A., Calogero A.E., Condorelli R., Frassetto F., La Corte A., Ridolfo F., Bosco P., Castiglione R., Salemi M. // *Eur. J. Histochem.* 2012. V. 56. № 1. P. e9.
5. Csete B., Lengyel Z., Kádár Z., Battyáni Z. // *Pathol. Oncol. Res.* 2009. V. 15. № 1. P. 47–53.
6. Telli M.L., Ford J.M. // *Clin. Breast Cancer.* 2010. V. 10. Suppl 1. P. E16–22.
7. Shimizu S., Nomura F., Tomonaga T., Sunaga M., Noda M., Ebara M., Saisho H. // *Oncol. Rep.* 2004. V. 12. P. 821–825.
8. Rojo F., García-Parra J., Zazo S., Tusquets I., Ferrer-Lozano J., Menendez S., Eroles P., Chamizo C., Servitja S., Ramírez-Merino N., et al. // *Ann. Oncol.* 2012. V. 23. P. 1156–1164.
9. Domagala P., Huzarski T., Lubinski J., Gugala K., Domagala W. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 127. P. 861–869.
10. Michels J., Vitale I., Galluzzi L., Adam J., Olausson K.A., Kepp O., Senovilla L., Talhaoui I., Guegan J., Enot D.P., et al. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. P. 2271–2280.
11. Simbulan-Rosenthal C.M., Ly D.H., Rosenthal D.S., Konopka G., Luo R., Wang Z.Q., Schultz P.G., Smulson M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 21. P. 11274–11279.
12. Dajee M. // *Nature.* 2003. V. 421. P. 639–643.
13. Martín-Oliva D., O'Valle F., Muñoz-Gómez J.A., Valenzuela M.T., Nuñez M.I., Aguilar M., Ruiz de Almodóvar J.M., García del Moral R., Oliver F.J. // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 5275–5283.
14. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C., Imbert V., Hofman V., Zangari J., Bille K., Robert C., Bressac-de Paillerets B., Hofman P., et al. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1245–1261.
15. Tulin A., Spradling A. // *Science.* 2003. V. 299. P. 560–562.
16. Petesch S.J., Lis J.T. // *Cell.* 2008. V. 134. № 1. P. 74–84.
17. Leu J.I., Pimkina J., Frank A., Murphy M.E., George D.L. // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. P. 15–27.
18. Cazzalini O., Donà F., Savio M., Tillhon M., Maccario C., Perucca P., Stivala L.A., Scovassi A.I., Prosperi E. // *DNA Repair.* 2010. V. 9. P. 627–635.
19. Abbas T., Dutta A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. P. 400–414.
20. Schiewer M.J., Goodwin J.F., Han S., Brenner J.C., Augello M.A., Dean J.L., Liu F., Planck J.L., Ravindranathan P., Chinnaiyan A.M., et al. // *Cancer Discov.* 2012. V. 12. P. 1134–1149.
21. Purnell M.R., Whish W.J. // *Biochem. J.* 1980. V. 185. P. 775–777.
22. Durkacz B.W., Omidiji O., Gray D.A., Shall S. // *Nature.* 1980. V. 283. P. 593–596.
23. Milam K.M., Cleaver J.E. // *Science.* 1984. V. 223. № 4636. P. 589–591.
24. Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1569–1575.
25. Jagtap P., Szabó C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. V. 4. P. 421–440.
26. Ruf A., de Murcia G., Schulz G.E. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 3893–3900.
27. Canan Koch S.S., Thoresen L.H., Tikhe J.G., Maegley K.A., Almasy R.J., Li J., Yu X.H., Zook S.E., Kumpf R.A., Zhang C., et al. // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. № 23. P. 4961–4974.
28. Skalitzky D.J., Marakovits J.T., Maegley K.A., Ekker A., Yu X.H., Hostomsky Z., Webber S.E., Eastman B.W., Almasy R., Li J., et al. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. № 2. P. 210–213.
29. Tikhe J.G., Webber S.E., Hostomsky Z., Maegley K.A., Ekkers A., Li J., Yu X.H., Almasy R.J., Kumpf R.A., Boritzki T.J., et al. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 22. P. 5467–5481.
30. Calabrese C.R., Batey M.A., Thomas H.D., Durkacz B.W., Wang L.Z., Kyle S., Skalitzky D., Li J., Zhang C., Boritzki T., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. № 7. P. 2711–2718.
31. Marsischky G.T., Wilson B.A., Collier R.J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 3247–3254.
32. Thomas H.D., Calabrese C.R., Batey M.A., Canan S., Hostomsky Z., Kyle S., Maegley K.A., Newell D.R., Skalitzky D., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2007. V. 6. № 3. P. 945–956.
33. Mason K.A., Buchholz T.A., Wang L., Milas Z.L., Milas L. // *Am. J. Clin. Oncol.* 2014. V. 37. № 1. P. 90–100.
34. Ekblad T., Schüller H., Macchiarulo A. // *FEBS J.* 2013. V. 280. № 15. P. 3563–3575.
35. Hilton J.F., Tran M.T., Shapiro G.I. // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2013. V. 18. P. 1392–1406.
36. Papeo G., Montagnoli A., Ciria A. // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2013. V. 4. P. 503–514.
37. Sonnenblick A., Azim H.A. Jr., Piccart M. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015. V. 12. P. 27–41.
38. Curtin N.J., Szabo C. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 6. P. 1217–1256.
39. De Lorenzo S.B., Hurley R.M., Kaufmann S.H. // *Front. Oncol.* 2013. V. 11. № 3. P. 228.
40. Kuzminov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 15. P. 8241–8246.
41. Chapman J.R., Boulton S.J. // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 47. № 4. P. 497–510.
42. Deindl S., Hota S.K., Blosser T.R., Prasad P., Bartholomew B., Zhuang X. // *Cell.* 2013. V. 152. № 3. P. 442–452.
43. Min I.M., Core L.J., Munroe R.J., Schimenti J., Lis J.T. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 7. P. 742–754.
44. Patel A.G., Sarkaria J.N., Kaufmann S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 8. P. 3406–3411.
45. Bryant H.E., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T. // *Nature.* 2005. V. 434. № 7035. P. 913–917.
46. Farmer H., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M., et al. // *Nature.* 2005. V. 14. № 434. P. 917–921.
47. Donoho G., Brenneman M.A., Cui T.X., Donoviel D., Vogel H., Goodwin E.H., Chen D.J., Hasty P. // *Genes, Chromosomes Cancer.* 2003. V. 36. P. 317–331.
48. McCabe N., Turner N.C., Lord C.J., Kluzek K., Bialkowska A., Swift S., Giavara S., O'Connor M.J., Tutt A.N., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 8109–8115.
49. Li M., Yu X. // *Cancer Cell.* 2013. V. 23. № 5. P. 693–704.
50. Miwa M., Masutani M. // *Cancer Sci.* 2007. V. 98. P. 1528–1535.
51. Paddock M.N., Higdson R., Kolker E., Takeda S., Scharenberg A.M. // *DNA Repair.* 2011. V. 10. № 3. P. 338–343.
52. Fong P.C., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M.J., Ashworth A., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. P. 123–134.
53. Hutchinson L. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010. V. 7. P. 549.
54. Chan S.L. // *Lancet.* 2010. V. 376. № 9737. P. 211–213.
55. Bunting S.F., Callen E., Wong N., Chen H.-T., Polato F., Gunn A., Bothmer A., Feldhahn N., Fernandez-Capetillo O., Cao L., et al. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 243–254.
56. Mukhopadhyay A., Elattar A., Cerbinskaite A., Wilkinson S.J., Drew Y., Kyle S., Los G., Hostomsky Z., Edmondson R.J., Curtin N.J. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 16. P. 2344–2351.

57. Mendes-Pereira A.M., Brough R., McCarthy A., Taylor J.R., Kim J.S., Waldman T., Lord C.J., Ashworth A. // *EMBO Mol. Med.* 2009. V. 1. P. 315–322.
58. Buisson R., Coulombe Y., Launay H., Cai H., Stasiak A.Z., Stasiak A., Xia B., Masson J.Y. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 1247–1254.
59. Williamson C.T., Turhan A.G., Zamò A., O'Connor M.J., Bebb D.G., Lees-Miller S.P. // *Mol. Cancer Ther.* 2010. V. 9. P. 347–357.
60. Villano J.L., Seery T.E., Bressler L.R. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009. V. 64. P. 647–655.
61. Boulton S., Pemberton L.C., Porteous J.K., Curtin N.J., Griffin R.J., Golding B.T., Durkacz B.W. // *Br. J. Cancer.* 1995. V. 72. P. 849–856.
62. Delaney C.A., Wang L.Z., Kyle S., Srinivasan S., White A.W., Calvert A.H., Curtin N.J., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Maegley K., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 2860–2867.
63. Liu S.K., Coackley C., Krause M., Jalali F., Chan N., Bristow R.G. // *Radiother. Oncol.* 2008. V. 88. P. 258–268.
64. Liu X., Shi Y., Guan R., Donawho C., Luo Y., Palma J., Zhu G.D., Johnson E.F., Rodriguez L.E., Ghoreishi-Haack N., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2008. V. 6. P. 1621–1629.
65. Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., d'Amati G., Portarena I., Zupi G., Bonmassar E., Graziatia G. // *Blood.* 2002. V. 99. P. 2241–2244.
66. Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., D'Amati G., Vergati M., Portarena I., Xu W., Kalish V., Zupi G., Zhang J., Graziani G. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 5370–5379.
67. Palma J.P., Rodriguez L.E., Montgomery D., Ellis P.A., Bukofzer G., Niquette A., Liu X., Shi Y., Lasko L., Zhu G.D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 7277–7290.
68. Donawho C.K., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. P. 2728–2737.
69. Daniel R.A., Rozanska A.L., Mulligan E.A., Drew Y., Thomas H.D., Castelbuono D.J., Hostomsky Z., Plummer E.R., Tweddle D.A., Clifford S.C., et al. // *Br. J. Cancer.* 2010. V. 103. P. 1588–1596.
70. Miknyoczki S.J., Jones-Bolin S., Prichard S. // *Mol. Cancer Ther.* 2003. V. 2. P. 371–382.
71. Calabrese C.R., Almasy R., Barton S., Batey M.A., Calvert A.H., Canan-Koch S., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Kumpf R.A., Kyle S., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. V. 96. P. 56–67.
72. Kaufmann S.H., Charron M., Burke P.J., Karp J.E. // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 1255–1260.
73. El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H., Caldecott K.W. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 5526–5533.
74. Plo I., Liao Z.Y., Barceló J.M., Kohlhagen G., Caldecott K.W., Weinfeld M., Pommier Y. // *DNA Repair.* 2003. V. 2. P. 1087–1100.
75. Malanga M., Althaus F.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 83. P. 354–364.
76. Mattern M.R., Mong S.M., Bartus H.F., Mirabelli C.K., Crooke S.T., Johnson R.K. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 1793–1798.
77. Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., Muzi A., Mazzon E., Vergati M., Forini O., Lapidus R., Xu W., Dorio A.S., et al. // *FASEB J.* 2006. V. 20. P. 1709–1711.
78. Zander S.A., Kersbergen A., van der Burg E., de Water N., van Tellingen O., Gunnarsdottir S., Jaspers J.E., Pajic M., Nygren A.O., Jonkers J., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 1700–1710.
79. Ben-Hur E., Chen C.C., Elkind M.M. // *Cancer Res.* 1985. V. 45. P. 2123–2127.
80. Russo A.L., Kwon H.C., Burgan W.E., Carter D., Beam K., Weizheng X., Zhang J., Slusher B.S., Chakravarti A., Tofilon P.J., Camphausen K. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 607–612.
81. Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N., Parker K.M., Cassel T.N., Helleday T. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 7158–7169.
82. Barendsen G.W., van Bree C., Franken N.A.P. // *Int. J. Oncol.* 2001. V. 19. P. 247–256.
83. Leopold W.R., Sebolt-Leopold J.S. *Chemical approaches to improved radiotherapy.* Boston: Kluwer, 1992. P. 179–196.
84. Albert J.M., Cao C., Kim K.W., Willey C.D., Geng L., Xiao D., Wang H., Sandler A., Johnson D.H., Colevas A.D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. P. 3033–3042.
85. Barreto-Andrade J.C., Efimova E.V., Mauceri H.J., Beckett M.A., Sutton H.G., Darga T.E., Vokes E.E., Posner M.C., Kron S.J., Weichselbaum R.R. // *Mol. Cancer Ther.* 2011. V. 10. P. 1185–1193.
86. Holl V., Coelho D., Weltin D., Hyun J.W., Dufour P., Bischoff P. // *Anticancer Res.* 2000. V. 20. P. 3233–3241.
87. Magan N., Isaacs R.J., Stowell K.M. // *Anticancer Drugs.* 2012. V. 3. P. 627–637.
88. Mason K.A., Valdecanas D., Hunter N.R., Milas L. // *Invest. New Drugs.* 2008. V. 26. P. 1–5.
89. Guggenheim E.R., Ondrus A.E., Movassaghi M., Lippard S.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. V. 16. P. 10121–10128.
90. Ohsaki K., Sakakibara S., Do E., Yada K., Yamanishi K. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 9936–9946.
91. Wang H., Tang Q., Maul G.G., Yuan Y. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2867–2882.
92. Nakajima H., Ohkuma K., Ishikawa M., Hasegawa T. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. V. 312. № 2. P. 472–481.
93. Mandery K., Fromm M.F. // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 165. P. 345–362.
94. Kopetz S. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26 (Suppl.). P. a3577.
95. Mahany J.J. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26 (Suppl.). P. a3579.
96. Kotova E., Tulin A.V. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 780. P. 491–516.
97. Maluchenko N.V., Kotova E., Chupyrkina A.A., Nikitin D.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. // *Mol. Biol. (Mosc.).* 2015. V. 49. № 1. P. 1–15.
98. Kotova E., Tulin A.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 14. P. 6406–6411.
99. Dantzer F. // *FEBS J.* 2013. V. 280. № 15. P. 3508–3518.
100. O'Donnell A., Yang S.H., Sharrocks A.D. // *EMBO Rep.* 2013. V. 12. P. 1084–1091.
101. Thomas C. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 1124–1137.
102. Mouchiroud L., Auwerx J. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. V. 48. № 4. P. 397–408.
103. Bürkle A. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 1046–1065.
104. Ma Y., He X., Nie H., Hong Y., Sheng C., Wang Q., Xia W., Ying W. // *Curr. Drug Targets.* 2012. V. 13. № 2. P. 222–229.
105. Ying W. // *Scientifica (Cairo).* 2013. V. 2013. Article ID 691251.
106. Baxter P., Xu Y., Swanson R.A. // *Transl. Stroke Res.* 2014. V. 5. № 1. P. 136–144.
107. Rosado M.M., Novelli F., Pioli C. // *Immunology.* 2013. V. 139. № 4. P. 428–437.
108. Nishikimi M., Kameshita I., Taniguchi T., Shizuta Y. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 6102–6105.
109. Kameshita I., Taniguchi T., Shizuta Y. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 4770–4776.

УДК 57.017.35-611.83

Восстановление поврежденного нерва с помощью клеточной терапии (фундаментальные аспекты)

Е. С. Петрова

Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

E-mail: lemmorphol@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.03.2015

РЕФЕРАТ В обзоре обобщены результаты экспериментальных исследований последних лет, посвященных стимуляции восстановления периферических нервных проводников с помощью стволовых и прогениторных клеток. Проанализированы данные о подборе клеточных элементов, способных вырабатывать нейротрофические и ростовые факторы и выживать при пересадке в поврежденный нервный ствол или кондуит. Описаны способы усовершенствования кондуитов, соединяющих сегменты перерезанного нерва. Представлены данные о механизмах влияния пересаженных клеток на рост и регенерацию нервных волокон реципиента. Отмечены возможные негативные последствия трансплантации стволовых клеток. Подчеркнута необходимость дальнейшего изучения судьбы пересаженных клеток в условиях измененного микроокружения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА клеточная терапия, нерв, регенерация, стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПНС – периферическая нервная система; СК – стволовые клетки; NGF – фактор роста нервов; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; bFGF – основной фактор роста фибробластов; HGF – фактор роста гепатоцитов; NF-3 – нейротрофин-3; МРТ – магнитно-резонансная томография; GFP – зеленый флуоресцентный белок; МСК – мезенхимные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время регенерацию периферических нервных проводников стимулируют с использованием различных экспериментальных подходов. Традиционно ведется разработка способов ускорения восстановления нервных проводников с помощью лекарственных средств [1], физических факторов (магнитное поле) [2, 3] и электростимуляции [4–6]. Совершенствуются методы нейропластики [7] и шовной техники [8]. Один из подходов – создание специальных биоинженерных конструкций (кондуитов), которые могли бы заменить аутотрансплантат сегмента нерва, применяемый в клинической практике для соединения проксимального и дистального концов нервного проводника после травмы. Тем не менее все эти подходы недостаточно эффективны для решения проблемы восстановления поврежденного нерва. Это объясняется тем, что, несмотря на большую историю репаративной регенерации нервов, начиная с работ А. Валлера, С. Рамон-и-Кахаля, Б.С. Дойникова [9–11], молекулярные механизмы, регулирующие сложные процессы, развивающиеся в периферических нервных проводниках после травмы, до сих пор не ясны и требуют глубокого изучения.

После травмирования нерва путем пережатия или перерезки в дистальном его отделе начинаются деструктивные процессы, включающие в себя дегенерацию осевых цилиндров нервных волокон, разрушение миелиновых оболочек, распад миелина и активацию макрофагов. Все эти изменения соответствуют понятию «валлеровская дегенерация». Практически одновременно в поврежденном нерве начинаются репаративные процессы: наблюдается рост нервных волокон из проксимального отдела на периферию. В месте повреждения нерва часто образуется соединительно-тканый рубец, препятствующий направленному росту регенерирующих аксонов, что, в свою очередь, приводит к формированию невромы. Кроме того, в тканях и органах-мишенях после травмирования нерва развиваются дистрофические изменения, которые снижают эффективность реиннервации. Все это указывает на необходимость поиска новых способов ускорения регенерации нервных проводников.

Известно, что важную роль в регенерации нервных проводников играют гуморальные факторы, участвующие в создании микроокружения, необходимого для роста аксонов. К ним относятся ростовые

и нейротрофические факторы, цитокины и белки внеклеточного матрикса [12–14]. Для исследования их влияния на репаративные процессы разрабатываются различные модели: введение факторов роста в поврежденный нерв или кондуит с помощью микрокапсул или мини-насосов (инъекционных аппаратов, обеспечивающих постоянное поддержание концентрации вещества в течение длительного времени); трансплантация клеточных элементов, секретирующих необходимые факторы, и применение плазмид, способствующих продукции нейротрофических и ангиогенных веществ [15–18].

Один из перспективных способов стимуляции регенерации нерва – клеточная терапия, в которой источником трофических и ростовых факторов служат трансплантируемые клетки. К таким элементам, в частности, относятся сингенные шванновские клетки (нейролеммоциты) [12, 13, 15]. После травмирования нервных стволов именно шванновские клетки, участвующие в процессе миелинизации и вырабатывающие ряд таких биологически активных веществ, как NGF, VEGF, BDNF и другие, обеспечивают успех регенерации нервных волокон. Однако получение жизнеспособных донорских шванновских клеток в нужном количестве не всегда возможно.

В последнее десятилетие в клеточной терапии травмированных нервов предложено наряду со шванновскими клетками использовать эмбриональные стволовые клетки, МСК, клетки обонятельных структур, стволовые клетки волосяных фолликулов и другие клеточные элементы. Результаты этих работ обобщены в обзорах [19–25]. Однако число экспериментальных исследований в этой области, выполненных как зарубежными, так и отечественными авторами, увеличивается, появляются новые требующие решения вопросы. Цель настоящей работы состояла в обобщении результатов исследований, выполненных за последние три года.

На современном этапе на первый план выходят следующие задачи: подбор клеточных элементов, способных вырабатывать нейротрофические и ростовые факторы и длительно выживать при пересадке в поврежденный нерв или в кондуит; изучение механизмов их влияния на рост и регенерацию нервных волокон; усовершенствование кондуитов и их наполнителей; поиск способов повышения эффективности терапии с использованием СК; разработка методов оценки восстановления нерва после повреждения и применения клеточной терапии. В единичных работах ставится вопрос о возможных негативных последствиях такой терапии.

Влияние клеточной терапии на регенерацию поврежденных нервных стволов изучают с использованием различных моделей. Клетки вводят

непосредственно в травмированный нерв, в кондуит, соединяющий концы перерезанного нерва, внутривенно или в иннервируемую мышцу [26]. Используются различные модели повреждения нерва: передавливание зажимом [27–31], наложение лигатуры [32], перерезка с последующим наложением швов [33]. Отдельно стоят работы, в которых для соединения проксимального и дистального сегментов перерезанного нерва используют специальные кондуиты. В последние годы проводятся поиск биodeградируемых материалов для создания таких кондуитов и подбор специальных наполнителей с учетом создания микроокружения для трансплантируемых клеток [20, 34–36].

КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ НЕРВА

В настоящее время в большинстве экспериментов на травмированном нерве используются МСК, которые получают из разных источников: из костного мозга [37], жировой ткани [24, 25, 38–42], пуповины [43], амниотической жидкости [44]. Выбор таких источников МСК, как костный мозг или подкожная жировая клетчатка, связан с доступностью их получения и возможностью аутологичных пересадок. Кроме того, МСК имеют еще одно свойство, которое делает их привлекательным материалом для пересадок – способность модулировать иммунный ответ. Показано, что МСК обладают иммуносупрессорным действием [40, 45]. Анализ молекулярных механизмов взаимоотношений МСК и иммунокомпетентных клеток показал, что введение МСК приводит к угнетению функций Т- и В-лимфоцитов и ингибированию созревания дендритных клеток [46]. Однако результаты некоторых исследований противоречат этим наблюдениям. Так, МакГрат и соавт. [37] на модели поврежденного седалищного нерва крыс с использованием фибринового кондуита с фибриновым наполнителем показали, что введенные в кондуит МСК человека оказывают положительный эффект на регенерацию нерва только в том случае, если применяется иммуносупрессия циклоспорином А. Изучение макрофагальной реакции в кондуите через 3 недели после операции показало, что под действием иммунодепрессанта снижается число макрофагов и лимфоцитов, что опосредованно приводит к стимуляции роста аксонов. Противоречия в данных о влиянии экзогенных МСК на иммунную систему реципиента можно объяснить различиями в способах введения МСК в организм реципиента и источниках их получения. В опытах *in vitro* показано, что МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани или пупочного канатика, различаются по спо-

способности модулировать продукцию иммуноглобулинов в клетках В-лимфоидного ряда [47]. Установлено также, что МСК из разных источников различаются пластичностью, нейрогенным потенциалом и паракринной активностью [48, 49].

Отмечена высокая миграционная способность МСК [50]. Они оказывают влияние на регенерацию аксонов поврежденного нерва не только при введении непосредственно в место повреждения нерва или в конduit, соединяющий концы перерезанного нерва [26, 39, 51], но и при внутривенном введении [27, 30, 52]. МСК человека, благодаря их способности к миграции, через 7 сут после внутривенного введения мышам определяются в области повреждения седалищного нерва и ускоряют его функциональное восстановление [27].

В разрабатываемых методах клеточной терапии, наряду с МСК, используются нейральные стволовые клетки (НСК). Так, Лин и соавт. [53] выделяли НСК спинного мозга эмбрионов крыс на 14–15 сут развития и культивировали в течение 7 сут в определенных условиях. Когда клетки приобретали нейрональный и глиальный фенотип (начинали синтезировать β III-тубулин или GFAP соответственно), их взвесь вводили в дистальный конец перерезанного большеберцового нерва. Такая трансплантация способствовала восстановлению денервированной икроножной мышцы. Подобные исследования выполняли и ранее [54]. Новизна результатов работы Лин и соавт. [53] заключается в том, что авторы рекомендуют пересаживать клетки не сразу после повреждения нерва, а спустя 7 сут. Через несколько суток после повреждения в нерве заканчивается острая фаза воспаления, уменьшается концентрация воспалительных цитокинов, возрастает пролиферация шванновских клеток и синтез ими трофических факторов [53]. Такое микроокружение более благоприятно для пересаженных НСК, чем микроокружение, формирующееся в нерве сразу после повреждения.

Некоторые исследователи в качестве клеточной терапии, направленной на стимуляцию регенерации поврежденного нерва у мышей, используют нейральные стволовые клетки, выделенные из субвентрикулярной нейрогенной зоны взрослых мышей [55]. Такая терапия способствует выживанию мотонейронов спинного мозга реципиента, подвергающихся ретроградной дегенерации вследствие повреждения седалищного нерва. Кроме того, она приводит к увеличению числа регенерирующих миелинизированных аксонов в дистальном конце поврежденного нерва почти в 3 раза. Высказано предположение о том, что НСК, как и МСК, обладают иммуномодулирующим действием [55].

Американские [56] и японские [57] исследователи

независимо друг от друга применили для клеточной терапии поврежденного нерва грызунов индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Известно, что iPSCs, полученные из соматических клеток взрослого организма (в частности, фибробластов кожи) путем активации определенных генов, широко используются в экспериментальных работах в области регенеративной медицины. Это связано с тем, что iPSCs имеют высокий пролиферативный потенциал, их можно получить в необходимом количестве из клеток реципиента. Установлено, что наполнение этими клетками биodeградируемых кондуитов, соединяющих сегменты перерезанного нерва, приводит к увеличению роста регенерирующих аксонов реципиента в несколько раз по сравнению с контролем [57]. Этот эффект удалось еще больше усилить с помощью трех фундаментальных методологий: кондуита из биodeградируемых материалов, наполнения его iPSCs, а также введения в него микрокапсул, содержащих фактор роста bFGF [58]. Применение нейрогенных СК, полученных из iPSCs человека, позволило выявить пересаженные клетки в дистальном конце нерва среди нервных волокон реципиента [56]. Для этого ядерный антиген клеток человека выявили иммуногистохимическими методами [56]. Колокализация в этих клетках двух антигенов: ядерного антигена клеток человека и белка S100, маркера шванновских клеток, позволила утверждать, что пересаженные клетки дифференцируются в направлении нейролеммоцитов, а механизм, объясняющий стимуляцию роста аксонов, связан с участием экзогенных клеток в миелинизации регенерирующих волокон. Имеются данные, что при использовании разных моделей повреждения нерва iPSCs могут дифференцироваться в клетки различного типа, например, в нейроны, экспрессирующие β III-тубулин [59], или в гладкомышечные клетки кровеносных сосудов [60]. Учитывая результаты этих пионерских исследований, можно заключить, что закономерности дифференцировки iPSCs, развивающихся в условиях пересадки в поврежденный нерв или конduit, требуют дальнейшего изучения.

Индийские исследователи [33] применили в терапии поврежденного седалищного нерва крыс мононуклеарные клетки, выделенные из костного мозга. Через 1 месяц после введения этих клеток в разных концентрациях в место повреждения нерва наблюдали положительный дозозависимый эффект клеточной терапии. Однако авторы не высказывали предположений по поводу механизмов полученного эффекта. Возможно, он связан с паракринной активностью мононуклеарных клеток костного мозга, которую отмечают некоторые исследователи [61]. Можно также предположить, что экзогенные мононуклеар-

ные клетки способствуют более быстрому очищению области повреждения нерва от продуктов распада миелина, тем самым ускоряя репаративные процессы и рост аксонов.

Среди новых, ранее не используемых клеточных элементов, нужно отметить миогенные стволовые/прогениторные клетки, полученные из скелетной мышечной ткани [31, 62, 63]. Тамаки и соавт. [63] показали, что после пересадки в нерв такие клетки-предшественники способны дифференцироваться как в шванновские клетки, так и в соединительно-тканые клетки эндоневрия и периневрия, и в клетки кровеносных сосудов (эндотелиоциты, перициты, гладкомышечные клетки). Доступность и легкость получения таких клеток, возможность их использования для аутологичных пересадок привлекают исследователей, однако имеются данные и о негативных последствиях их применения [62].

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ПРОВОДНИКОВ

Механизмы благоприятного влияния клеточной терапии на регенерацию нервов изучены недостаточно. Можно выделить следующие возможные механизмы: дифференцировка экзогенных клеточных элементов в направлении шванновских клеток, их участие в миелинизации регенерирующих нервных волокон, выработка пересаженными клетками трофических факторов и белков внеклеточного матрикса, способствующих росту аксонов реципиента, стимуляция пролиферации и дифференцировки эндогенных клеток реципиента, стимуляция ангиогенеза, снижение воспалительной реакции в поврежденном нерве.

Дифференцировка СК в шванновские клетки

Обсуждается возможность формирования из пересаженных СК клеточных элементов, обладающих свойствами шванновских клеток. Некоторые авторы считают, что клеточные элементы могут дифференцироваться непосредственно в шванновские клетки после пересадки в нерв и участвовать в процессе миелинизации регенерирующих аксонов. Другие исследователи полагают, что это возможно только после предварительной «трансдифференцировки» или «предифференцировки» этих клеток в условиях *in vitro* перед пересадкой. Термин «предифференцировка» используется в случае применения НСК или ЭСК. О «трансдифференцировке» говорят, когда применяют МСК. Хотя здесь уместнее использовать термин «трансдетерминация», предложенный В.Е. Охотиным и соавт. [64]. Известно, что МСК в условиях *in situ* являются источником клеток тканей мезодермального происхождения: костной, мышечной,

жировой и т.д., они детерминированы в направлении дифференцировки в клетки соответствующих типов. При добавлении в культуральную среду различных биологически активных веществ их детерминация может изменяться – происходит трансдетерминация, приводящая к формированию из МСК клеток, подобных нейролеммоцитам, нейронам, астроцитам и др.

Томита и соавт. [28] изучали глиальную дифференцировку МСК, полученных из жировой ткани человека, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было подтверждено, что при культивировании с применением смеси глиальных факторов роста, добавленных в культуральную среду, возможно формирование из МСК клеток, обладающих отдельными свойствами нейролеммоцитов. Установлено, что МСК с «направленной дифференцировкой» отличаются от обычных МСК более высокой (в 7 раз) выживаемостью после пересадки в поврежденный большеберцовый нерв крысы. Кроме того, такие МСК (меченные GFP) способны участвовать в миелинизации регенерирующих аксонов: одна треть пересаженных клеток была ассоциирована с регенерирующими аксонами. В них наблюдалась колокализация GFP и P0, маркера нейролеммоцитов. Способность МСК дифференцироваться в клетки, проявляющие свойства нейролеммоцитов, отмечена и другими авторами [65, 66].

Некоторые исследователи считают, что большинство пересаженных МСК не дифференцируются в нейролеммоциты, они остаются в своем первоначальном состоянии [67], а стимуляция роста аксонов реципиента под действием клеточной терапии связана не с трансдифференцировкой экзогенных клеток, а с выработкой ими трофических факторов [26, 67, 68].

Секреция СК трофических факторов и белков внеклеточного матрикса

В большинстве работ, выполненных на поврежденном нерве за последние 3 года, при проведении клеточной терапии предлагается использовать МСК из разных источников: костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др. Широкое использование МСК в экспериментах, направленных на стимуляцию репаративных процессов, основано на их высокой секреторной активности [69]. Способность МСК вырабатывать трофические факторы, факторы роста и цитокины убедительно доказана [27, 38, 70, 71], причем, с возрастом эта способность снижается как у человека, так и у экспериментальных животных [72, 73].

Среди трофических факторов, вырабатываемых МСК и стимулирующих рост аксонов, следует назвать NGF, BDNF, NF-3, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I) [24, 27, 29, 38, 51].

Кроме того, МСК секретируют такие ангиогенные факторы, как VEGF и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [27, 38].

Убедительно показано, что МСК, полученные из жировой ткани и примененные для улучшения регенерации нерва, способны синтезировать BDNF. Установлено, что нейтрализация BDNF антителами к этому белку снижает его влияние на регенерацию нервных волокон [29]. С помощью специфических антител установлено также, что МСК, пересаженные в конduit, соединяющий сегменты перерезанного нерва, продуцируют bFGF [71].

Однако то, на какие именно процессы воздействуют вырабатываемые факторы, какие клеточные реакции они могут вызывать в регенерирующем нерве, изучено недостаточно. Считается, что нейротрофические факторы влияют на мотонейроны и чувствительные нейроны реципиента [26]. Показано, что нейротрофические факторы, вырабатываемые пересаженными в поврежденный нерв клетками, оказывают ретроградное нейропротективное воздействие на соответствующие мотонейроны и чувствительные нейроны реципиента, вследствие чего число аксонов в поврежденном периферическом нерве увеличивается. Предполагается, что МСК, введенные в поврежденный нерв, оказывают нейропротекторное действие на клетки чувствительного ганглия заднего корешка благодаря выработке наряду с BDNF эндотелиального фактора роста, фактора роста гепатоцитов и инсулиноподобного фактора роста [70].

Положительный эффект клеточной терапии проявляется уже в первую неделю после операции [29]. Известно, что в это время после любого травматического повреждения периферического нерва в дистальном его конце, как правило, наблюдается гибель аксонов и распад миелина [9, 74, 75]: после перерезки – в дистальном сегменте дегенерируют все нервные волокна; после передавливания – часть из них может сохраняться. В связи с этим можно предположить, что присутствие в передавленном нерве экзогенных клеток-предшественников с высокой паракринной активностью в первые несколько дней после повреждения способствует не столько росту аксонов, сколько их сохранности.

Стимуляция эндогенных клеток нерва реципиента

Эндогенные шванновские клетки создают микроокружение, необходимое для регенерации волокон периферического нерва. Именно эти клетки способны вырабатывать трофические факторы, цитокины и белки внеклеточного матрикса, необходимые для поддержания и роста нервных волокон [12–14]. Считается, что при клеточной терапии активируются шванновские клетки реципиента. Так, при вве-

дении в нерв или в конduit, соединяющий концы поврежденного нерва, СК наблюдается увеличение пролиферативной активности шванновских клеток реципиента и стимуляция секреции ими биологически активных веществ [51, 71, 76, 77]. Применение клеточной терапии (в данном случае НСК) приводит к увеличению экспрессии NGF и HGF в эндогенных шванновских клетках [77]. Оригинальное исследование провели Маркони и соавт. [27]. Исследуя состав кондиционной среды культуры МСК, показали, что в условиях *in vitro* МСК секретируют ряд нейростовых факторов, но не вырабатывают нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF). Оказалось, что после пересадки таких МСК в нерв концентрация GDNF в нервном стволе увеличивается. Сделан вывод, что клеточная терапия приводит к стимуляции собственных шванновских клеток, которые начинают вырабатывать GDNF в большей концентрации, чем в норме.

Улучшение регенерации нерва реципиента под влиянием клеточной терапии связано со стимуляцией ангиогенеза. Ранее отмечалось, что при хирургических вмешательствах регенерация нервных проводников зависит от состояния их кровеносных сосудов и уровня их кровоснабжения [78]. С помощью генной терапии подтверждено, что ряд ангиогенных факторов способствуют репаративным процессам в нервных проводниках [16, 17]. Улучшение кровоснабжения нерва под влиянием МСК связано с выработкой ими фактора роста фибробластов, эндотелиального фактора роста, плацентарного фактора роста и других ангиогенных белков [38]. Введение СК, полученных из жировой ткани, в фибриновый конduit, соединяющий сегменты перерезанного седалищного нерва, улучшает васкуляризацию кондуита и способствует регенерации нерва благодаря экспрессии пересаженными клетками VEGF-A и ангиопоэтина-1 [79].

Ингибирование роста соединительной ткани, уменьшение рубца

Воспаление и, как его следствие, разрастание соединительной ткани (фиброз) мешают росту периферических аксонов. Есть мнение, что клеточная терапия может препятствовать развитию этих процессов. Маркони и соавт. [27] исследовали дегенерацию в дистальном конце передавленного зажимом седалищного нерва крысы после введения МСК. Используя маркеры лимфоцитов (CD3) и моноцитов/макрофагов (CD11b), выявили значительное уменьшение воспалительных инфильтратов в поврежденном нерве уже через 7 сут, а также через 14 и 21 сут после введения МСК. Регулируя функцию клеток иммунной системы, МСК влияют на уровень воспаления и повреждения в тканях реципиента [46]. Хсу

и соавт. [80] изучали регенерацию перерезанного сегментального нерва крысы после соединения его проксимального и дистального сегментов силиконовым кондуитом со скаффолдом из хитозана и ламинина. К такой конструкции добавляли еще и МСК костного мозга крыс. Оценка процесса воспаления, основанная на подсчете числа эозинофилов и макрофагов на единицу площади гистологического препарата, показала, что стенки кондуита содержат значительное число воспалительных элементов, а применение МСК приводило к уменьшению их количества. По-видимому, эффект МСК связан с выработкой ими противовоспалительных цитокинов. Спектр цитокинов, синтезируемых МСК, охарактеризован в обзоре [81].

Имеются данные, согласно которым клеточная терапия поврежденного нерва с использованием НСК также может уменьшать воспалительную реакцию в нерве после операции. При введении НСК в поврежденном нерве снижается уровень провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1 и 6) [52]. Следует отметить, что роль цитокинов в аксональной дегенерации и регенерации изучена недостаточно, поэтому применение дополнительных клеток, вырабатывающих эти факторы, требует углубленных фундаментальных исследований.

БИОИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ СОЕДИНЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА

В практической медицине в тех случаях, когда повреждение нервного сегмента достигает трех и более сантиметров, для соединения проксимального и дистального концов используется трансплантация сегмента аутологичного нерва. Возникающие при этом осложнения (невромы), а также ограниченная возможность получения донорского материала привели к необходимости создания конструкций, заменяющих трансплантируемый аутологичный сегмент (см. обзоры [20, 35, 80, 82, 83]). Классификация кондуитов, применяемых для соединения сегментов поврежденных нервов, детально описана в обзоре [35].

В настоящее время продолжают поиски биodeградируемых материалов и специальных наполнителей, способствующих направленной регенерации периферических аксонов [84]. Такие конструкции должны удовлетворять следующим требованиям: они должны быть биосовместимыми, пористыми, биodeградируемыми и нетоксичными. При деградации кондуита не должно возникать воспалительной реакции.

В экспериментах на лабораторных животных разрабатываются конструкции, в качестве наполнителей в которых используются коллаген, фибрин, ламинин, гидрогель кератина. Представлены стратегии создания благоприятного микроокружения для ре-

генерирующих нервных волокон в кондуите, такие, как использование экзогенных ростовых факторов (фактор роста фибробластов, VEGF, нейротрофинов (NF-3, NGF), нейропоэтических цитокинов) и клеточная терапия. Назначение ростовых факторов заключается в том, чтобы способствовать миграции в кондуит и пролиферации шванновских клеток реципиента, которые, в свою очередь, определяют необходимое микроокружение для последующей регенерации нервных волокон.

Еще одно важное требование, предъявляемое к кондуитам, – создание благоприятных условий для трансплантируемых в них СК. Дифференцировка и выживаемость помещаемых в кондуит СК зависят от условий микроокружения [59, 85].

Некоторые кондуиты, хоть и обладают такими свойствами, как биосовместимость, отсутствие токсичности, биodeградируемость, недостаточно пригодны для выживания помещенных в них СК. Например, кондуиты из поликапролактона гидрофобны и могут препятствовать клеточной адгезии, а кондуиты из молочной и гликолевой кислот при деградации выделяют вещества, препятствующие росту клеток [80]. Благоприятный для выживания МСК костного мозга крыс кондуит из хитозана и ламинина также не лишен недостатков. Оказалось, что фрагменты деградации хитозана могут приводить к развитию хронического воспаления в нерве [80].

Помимо создания различных синтетических конструкций для соединения концов поврежденных нервов, продолжается поиск новых биологических заменителей фрагмента нерва. Нередко используются такие биологические кондуиты, как кровеносные сосуды [52, 86]. Следует отметить, что и в более ранних работах [74] использование фрагментов кровеносного сосуда для направленной регенерации перерезанного нерва привело к получению положительных результатов. В экспериментах, направленных на выбор биологических кондуитов для соединения проксимального и дистального концов нерва, изучено влияние компонентов внеклеточного матрикса на регенерацию нервных волокон [87]. В качестве кондуитов для поврежденного нерва крысы применили фрагменты артерии, фрагменты нервного ствола и участки дермы свиньи, лишённые клеток. Клеточные элементы из этих кондуитов были предварительно убраны с помощью специальных методов (см. ниже), а внеклеточный матрикс, свойственный этим органам, сохранен. Данные о составе внеклеточного матрикса получены с помощью иммуногистохимического выявления ряда белков: коллагенов типа I, III и IV, фибронектина и ламинина. Соотношение этих белков в артерии, нерве и дерме различно. Это позволило установить, что благоприятное воздействие

на регенерацию нерва оказывает микроокружение, содержащее ламинин и коллаген типа IV, но не фибронектин и коллаген типа I.

В настоящее время проведено несколько исследований с применением СК и фрагмента нерва, лишённого клеток, в качестве кондуита. Такой трансплантат содержит базальные мембраны и коллагеновые волокна, не препятствует пролиферации и миграции клеток и клеточной адгезии, кроме того, он способствует выживанию пересаженных в него СК [22, 67, 88, 89]. Чтобы пересаженные в такой конduit клетки сохраняли жизнеспособность, следует учитывать способ, с помощью которого удаляли собственные клеточные элементы нерва. Способы получения сегмента нерва для нейротрансплантации, не содержащего клеточных элементов, представлены в обзоре [22], в котором приведены протоколы таких методов удаления клеток из нервных стволов, как обработка низкими температурами, химическими детергентами и при помощи облучения.

Показано, что трансплантация лишённого собственных клеток сегмента нерва с введенными в него МСК жировой ткани крысы в поврежденный нерв кролика не вызывает отторжения или воспаления и стимулирует регенерацию нервных волокон реципиента [88]. Первыми трансплантат заселяют шванновские клетки реципиента. Среди них встречаются дифференцирующиеся в направлении нейролеммоцитов экзогенные МСК. Синтезируя NGF, BDNF и другие факторы, они создают микроокружение, сходное с эндоневрием. С помощью физиологических тестов, электрофизиологической оценки проводимости нерва и морфометрического анализа регенерирующих волокон установлено, что регенерация нерва через такой биологический конduit осуществляется в той же степени, что и через фрагмент аутологичного трансплантата нерва (так называемого «золотого стандарта» для изучения регенерации нерва в эксперименте) [88].

Таким образом, разнообразие используемых кондуитов достаточно велико. От того, из каких материалов состоит конduit и его наполнитель, зависит судьба помещенных в него СК. Вопрос об их выживании и дифференцировке в условиях пересадки в конduit нуждается в изучении. Есть мнение, что выживаемость СК после трансплантации невелика. Поэтому проводится поиск способов увеличения времени жизни пересаженных клеток.

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННОЙ НА УЛУЧШЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА

В последние годы для повышения выживаемости пересаживаемых СК и стимуляции регенерации нерв-

ных проводников разрабатываются способы дополнительной терапии.

В качестве такой терапии предлагают, например, совместную пересадку МСК с другими клеточными элементами. Показано, что культивирование МСК с леммоцитами определяет дифференцировку МСК в направлении шванновских клеток, причем последние вырабатывают нейротрофические факторы в большем количестве, чем обычные нейролеммоциты [90]. Использование смеси МСК со шванновскими клетками для наполнения биодеградируемого кондуита, соединяющего сегменты перерезанного нерва, оказалось более эффективным способом стимуляции регенерации поврежденного нерва, чем суспензии, состоящие из клеток одного вида [90].

Применение лазерной терапии способствует восстановлению поврежденных нервных проводников и улучшает регенерацию травмированного нерва через биодеградируемый конduit [91, 92]. Этот эффект связан с уменьшением воспалительных процессов в нерве.

На разных моделях показано, что использование в качестве комбинированной терапии различных биологически активных веществ способствует сохранности СК, пересаженных в конduit, усиливая тем самым их влияние на репаративные процессы. Так, применение МСК в сочетании с трансформирующим фактором $\beta 1$ приводит к уменьшению апоптоза пересаженных клеток. Следствием этого является улучшение ангиогенеза и снижение воспалительных процессов в поврежденном нерве [93]. Сочетание трансплантации НСК в конduit, состоящий из молочной и гликолевой кислот, с применением нейротрофического фактора NF-3 приводит к улучшению выживания пересаженных клеток. Благодаря созданию с помощью NF-3 благоприятного микроокружения НСК сохраняют жизнеспособность и дифференцируются, главным образом, в нейроны [35]. Показано, что применение СК в сочетании с субстанцией Р улучшает регенерацию нервов и репаративные процессы в коже [94].

В экспериментах на лабораторных животных разработана комбинированная терапия стромальными клетками костного мозга с одновременным введением хондроитиназы ABC (бактериального фермента, применяемого при грыжах межпозвоночных дисков) [95]. Подобная комбинированная терапия улучшает выживаемость пересаженных клеток и способствует регенерации нерва в большей степени, чем только клеточная. Молекулярный механизм этого эффекта заключается в том, что хондроитиназа ABC вызывает деградацию хондроитинсульфата, который способствует образованию соединительно-тканного рубца в поврежденных органах ПНС.

ОЦЕНКА ПОЛНОТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕРВА ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Во всех перечисленных экспериментальных исследованиях одной из важнейших задач является адекватная оценка степени регенерации нервных проводников. Морфометрический анализ регенерирующих аксонов, выполненный на полутонких поперечных срезах нерва или кондуита, мы считаем наиболее надежным и наглядным способом оценки регенерации нервных волокон. Этот метод применяется в большинстве работ, изучающих восстановление нервных проводников [4, 32, 36, 51, 91, 94].

Подсчет числа регенерирующих нервных волокон возможен также при помощи иммуногистохимического окрашивания определенных структурных белков, содержащихся в осевых цилиндрах нервных проводников, таких, как β III-тубулин [37, 79] или нейрофиламенты (НФ) [36, 51, 57]. Количественную оценку нервных волокон проводят также после их выявления с помощью иммуногистохимических реакций на НФ и белок P0 или основной белок миелина – маркеры шванновских клеток [28, 75]. Существует метод оценки полноты восстановления нерва путем измерения площади, занятой структурами, содержащими маркеры шванновских клеток или аксонов [51, 57].

Перечисленные иммуногистохимические методы позволяют оценивать регенерацию аксонов на поперечных срезах, проходящих через нерв. Существуют методические подходы, позволяющие оценивать рост нервных волокон реципиента и на продольных срезах. Длину регенерирующих волокон в поврежденном нерве на продольных срезах измеряют, применяя маркер регенерирующих аксонов – белок нервных окончаний и конусов роста GAP-43 [27]; основной маркер структур ПНС – белок PGP 9.5 [68]; аксональный маркер β III-тубулин [79].

Наряду с морфологической оценкой роста нервных волокон используют физиологические тесты [28, 30, 42, 54, 67] и оценивают изменение проводимости нервов электрофизиологическими методами [39, 53, 60, 75, 96].

Еще один метод оценки целостности нервных проводников – изучение ретроградной дегенерации мотонейронов спинного мозга и чувствительных нейронов спинального ганглия после повреждения нерва [40, 52, 79, 97]. С помощью этого метода показано, что введение МСК в конduit, состоящий из хитозана и ламинина и соединяющий проксимальный и дистальный сегменты перерезанного нерва крысы, приводит к увеличению числа жизнеспособных мотонейронов поясничного отдела спинного мозга реципиента в несколько раз по сравнению с использованием кондуита, не содержащего клетки [80]. Установлено

также, что МСК, введенные в конduit из поликапролактона, соединяющий концы перерезанного седалищного нерва крысы, препятствуют ретроградной дегенерации нейронов спинномозгового ганглия [70]. При этом нейропротективный эффект наблюдается только в том случае, если МСК предварительно подвергали дифференцировке в направлении шванновских клеток [70]. Имеются данные, что посттравматическое выживание чувствительных нейронов улучшается при аллотрансплантации в соответствующий поврежденный проводник нервной ткани эмбрионов [98].

Один из способов оценки регенерации нерва состоит в измерении массы и размеров иннервируемой этим нервом мышцы, а также в изучении ее структурных особенностей. Известно, что полному восстановлению нервов после их травмы препятствуют также структурные изменения, которые достаточно быстро возникают в тканях-мишенях после нарушения иннервации. Например, при перерезке седалищного нерва наблюдается атрофия икроножной мышцы. Уровень восстановления нервных волокон нерва оценивают с помощью измерения массы соответствующей мышцы, гистологического анализа ее мышечных волокон, иммуногистохимического исследования пре- и постсинаптических отделов нервно-мышечных синапсов [34, 54, 65, 86, 96, 99].

В 2012 году появились работы, в которых для мониторинга регенерации нерва после повреждения и после трансплантации МСК стали использовать МРТ [100, 101]. Предварительное мечение МСК супермагнитными наночастицами оксида железа позволяет с помощью МРТ проследить судьбу пересаженных клеток [41, 102].

НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Возможные негативные последствия клеточной терапии обсуждали ранее многие исследователи [103–108]. Среди негативных последствий применения СК выделяют иммунный ответ реципиента на введение чужеродных клеток, стимуляцию новообразований, развитие воспаления и соединительно-тканного рубца, активацию микрофлоры и др. Отмечают также, что введение эмбриональных закладок или стволовых клеток в поврежденные нервные стволы экспериментальных животных может приводить к нежелательным последствиям [62, 85, 109].

Среди исследований, выполненных в течение последних трех лет, практически не встречается работ, в которых обсуждается проблема опухолевого перерождения трансплантируемых в нерв стволовых клеток. Это связано с отказом от использования в клеточной терапии ЭСК, обладающих наибольшей

среди СК способностью трансформироваться в опухолевые клетки. НСК используют лишь после их прединференцировки, например, в нервные или глиальные клетки, что уменьшает риск перерождения в опухолевые клетки.

Однако поиск новых источников клеток для клеточной терапии иногда дает неожиданные результаты. Лавазани и соавт. [62] для терапии поврежденного нерва предложили миогенные стволовые/прогениторные клетки (MDSPC), которые выделяли из скелетной мышцы взрослых мышей. Показано, что в условиях *in vitro* они образуют структуры, сходные с нейросферами, и экспрессируют маркеры не только миогенных клеток (десмин и актин гладкомышечных клеток), но и маркеры, свойственные нейронам и глиоцитам. Установлено, что после введения в поврежденный нерв крысы MDSPC трансформируются и через 11 недель образуют опухоли больших размеров. Одновременно такие клетки пересадили в мышцу. В условиях характерного для этих клеток микроокружения MDSPC подвергались нормальной дифференцировке в миоциты, что еще раз показывает, насколько велико значение микроокружения для дифференцировки пересаженных клеток-предшественников.

По-видимому, к успеху может привести использование только подвергнутых предварительной дифференцировке МСК, а недифференцированные МСК использовать в клеточной терапии поврежденного нерва опасно [85, 110]. Риск возникновения опухолей необходимо оценивать в ходе долговременных наблюдений. В настоящее время в случае подходов к клеточной терапии поврежденного нерва таких наблюдений немного. В отдельных работах, в которых срок наблюдений достигает года, не отмечено негативных последствий трансплантации [56, 111].

Следует отметить, что значительное внимание уделяется взаимоотношениям МСК с опухолевыми клетками. Это связано с тем, что из-за большого разнообразия свойств МСК по-разному действуют на рост различных опухолей. Есть данные, что благодаря таким свойствам, как ангиогенный эффект, ростстимулирующее и иммуносупрессорное действие, МСК способны поддерживать рост злокачественных образований [112, 113]. Однако МСК способны также подавлять опухолевый рост [69, 114]. Показано, что в процессе продолжительного сокультуривания МСК, полученных из эмбрионального костного мозга мышей, с клетками глиомы U251MG характер действия МСК на пролиферацию опухолевых клеток может изменяться: на ранних сроках культивирования МСК активируют, а затем ингибируют пролиферацию клеток глиомы [115]. Изучение взаимоотношений МСК с опухолевыми тканями про-

должается, однако накопленный материал недостаточен для однозначных выводов и необходимо проведение дальнейших исследований.

Наряду с работами, в которых отмечено негативное влияние клеточной терапии на реципиента, опубликованы данные о том, что эффект от применения клеточной терапии незначителен или отсутствует вовсе [116]. Возможно, что этот эффект проявляется непродолжительное время, как в случае использования СК на других экспериментальных моделях [108, 117]. Все эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во многих работах, посвященных разработке новых клеточных технологий, направленных на стимуляцию восстановления нерва, показано, что клеточная терапия может способствовать росту нервных волокон и улучшать их проводимость. Однако механизмы влияния экзо- и эндогенных клеток на репаративные процессы в тканях реципиента изучены недостаточно. Мало исследованы механизмы воздействия клеточной терапии на собственные клетки нерва реципиента: нейролеммоциты, макрофаги, клетки сосудов, клетки рыхлой соединительной ткани, клетки эпилепсии и периневрия.

В большинстве работ, выполненных в последние годы, в качестве клеточной терапии предлагается использовать МСК, полученные из разных источников: костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др. Благодаря синтезу различных биологически активных веществ они могут способствовать репаративным процессам в поврежденных тканях. Кроме того, их использование позволяет проводить аутологичные пересадки.

Результаты экспериментов, выполненных на лабораторных животных в течение последнего десятилетия, нашли продолжение в первых попытках клинических исследований [118–121]. Кроме того, в 2012 году впервые на модели диабетической полинейропатии попытались использовать клеточную терапию для восстановления иннервации у животных [60, 93].

Следует отметить, что, несмотря на большое число публикаций, судьба пересаживаемых стволовых клеток и клеток-предшественников до конца не ясна [39, 85, 122]. Эта проблема особенно актуальна в связи с применением новых биоинженерных конструкций, выступающих в качестве кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты поврежденного нерва. В каждой из таких конструкций создается уникальное микроокружение, определяющее возможность выживания и модификацию направления развития пересаженных клеток. Оказалось, что для обеспечения выживания пересаженных

в нерв или кондукт клеток необходимы дополнительные терапевтические воздействия.

Таким образом, продолжается поиск способов стимуляции направленной регенерации нервных проводников. Использование в опытах, выполненных на поврежденном нерве, клеточной терапии привело к возникновению новых вопросов, требующих углубленных фундаментальных исследований. Для создания новых безопасных медицинских технологий необходимо накопление знаний о прецифференцировке и трансдетерминации пересаженных СК, что будет способствовать расшифровке сложных

молекулярных и клеточных механизмов действия клеточной терапии на репаративные процессы в тканях нерва реципиента. Для исключения негативных последствий клеточной терапии необходимо хорошо понимать судьбу пересаженных стволовых клеток и клеток-предшественников в течение сроков, соизмеримых с продолжительностью жизни лабораторного животного. Совершенствование кондуктов и их наполнителей следует осуществлять, учитывая необходимость создания условий, благоприятных как для выживания, так и для дифференцировки и функционирования пересаженных в них клеток. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mohammadi R., Azad-Tigran M., Amini K. // *Injury*. 2013. V. 44. № 4. P. 565–569.
- Нинель В.Г., Норкин И.А., Пучиньян Д.М., Богомолова Н.В., Коршунова Г.А., Матвеева О.В., Айтемиров Ш.М. // *Медицинские науки. Фундаментальные исследования*. 2012. № 12. С. 336–340.
- Beck-Broichsitter В.Е., Lamia A., Geuna S., Fregnan F., Smeets R., Becker S.T., Sinis N. // *Biomed. Res. Int*. 2014. V. 2014. P. 401760.
- Щудло Н.А., Борисова И.В., Щудло М.М. // *Морфология*. 2012. Т. 142. № 12. С. 30–35.
- Maciel F.O., Viterdo F., Chinaque L.F.C., Souza B.M. // *Acta Cir. Bras*. 2013. V. 28. № 1. P. 39–47.
- de Assis D.C.M., Lima K.M., Goes B.T., Cavalcanti J.Z., Paixão A.B., Vannier-Santos M.A., Martinez A.M., Baptista A.F. // *Biomed. Res. Int*. 2014. V. 2014. P. 572949.
- Меркулов М.В., Голубев И.О., Крупаткин А.И., Кузьмичев В.А., Бушуев О.М., Ширяева Г.Н., Кутепов И.А. // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2012. № 3. С. 53–58.
- Берснев В.П., Хамзаев Р.И., Борода Ю.И. // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2009. Т. 168. № 1. С. 61–63.
- Waller A. // *Lond. J. Med*. 1852. V. 4. № 43. P. 609–625.
- Ramon y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. L.: Oxf. N. Milford. 1928. V. 1–2. 50 с.
- Дойников Б.С. *Избранные труды по нейроморфологии и невропатологии*. М.: Медгиз, 1955. 468 с.
- Gordon T. // *Neurosurgical Focus*. 2009. V. 26. № 2. P. E3.
- Lutz A.B., Barres B.A. // *Developmental Cell*. 2014. V. 28. P. 7–17.
- Gu Y., Zhu J., Xue C., Li Z., Ding F., Yang Y., Gu X. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 7. P. 2253–2263.
- Pfister L.A., Papalonzos M., Merkle H.R., Gander B. // *J. Peripher. Nerv. Syst*. 2007. V. 12. № 2. P. 65–82.
- Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А., Трофимова А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Исламов Р.Р., Чельшев Ю.А., Ризванов А.А. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011. Т. 6. № 3. С. 67–70.
- Чельшев Ю.А., Мухамедшина Я.Ю., Шаймарданова Г.Ф., Николаев С.И. // *Неврол. вестник (журн. им. В.М. Бехтерева)*. 2012. Т. 44. № 1. С. 76–83.
- Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Богов А.А. (мл.), Галлямов А.Р., Киясов А.П., Богов А.А. // *Практическая медицина*. 2013. Т. 69. № 1–2. С. 99–103.
- Walsh S., Midha R. // *Neurosurgery*. 2009. V. 65. № 4. P. 80–86.
- Chimutengwende-Gordon M., Khan W. // *Open Orthop. J*. 2012. V. 6. № 1. P. 103–107.
- Петрова Е.С. // *Цитология*. 2012. Т. 54. № 7. С. 525–540.
- Szynkaruk M., Kemp S.W.P., Wood M.D., Gordon T., Borschel G.H. // *Tissue Eng. Part B. Rev*. 2013. V. 19. № 1. P. 83–96.
- Zack-Williams S.D., Butler P.E., Kalaskar D.M. // *World J. Stem. Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 51–64.
- Widgerow A.D., Salibian A.A., Kohan E., Sartinferreira T., Afzel H., Tham T., Evans G.R. // *Microsurgery*. 2014. V. 34. № 4. P. 324–330.
- Martinez A.M., Goulart C.O., Ramalho Bdos S., Oliveira J.T., Almeida F.M. // *World J. Stem. Cells*. 2014. V. 6. № 2. P. 179–194.
- Fairbairn N.G., Meppelink A.M., Ng-Glazier J., Randolph M.A., Winograd J.M. // *World J. Stem. Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 11–26.
- Marconi S., Castiglione G., Turano E., Bissolotti G., Angiari S., Farinazzo A., Constantin G., Bedogni G., Bedogni A., Bonetti B. // *Tissue Engineering*. 2012. V. 18. № 11–12. P. 1264–1272.
- Tomita K., Madura T., Mantovani C., Terenghi G. // *J. Neurosci. Res*. 2012. V. 90. № 7. P. 1392–1402.
- Карагяур М.Н. *Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ФГБУ РКНПК МЗ РФ*, 2013.
- Matthes S.M., Reimers K., Janssen I., Liebsch C., Kocsis J.D., Vogt P.M., Radtke C. // *Biomed. Res. Int*. 2013. V. 2013. P. 573169.
- Zeng X., Zhang L., Sun L., Zhang D., Zhao H., Jia J., Wang W. // *Exp. Ther. Med*. 2013. V. 5. № 1. P. 193–196.
- Петрова Е.С., Исаева Е.Н. // *Изв. АН. Сер. биол.* 2014. № 6. С. 549–556.
- Raheja A., Suri V., Suri A., Sarkar C., Srivastava A., Mohanty S., Jain K.G., Sharma M.C., Mallick H.N., Yadav P.K., et al. // *J. Neurosurg*. 2012. V. 117. № 6. P. 1170–1181.
- Xiong Y., Zhu J., Fang Z.U., Zeng C.G., Qi G.L., Li M.H., Zhang W., Quan D.P., Wan J. // *Inter. J. Nanomedicine*. 2012. V. 7. P. 1977–1989.
- Daly W., Yao L., Zeugolis D., Windebank A., Pandit A. // *J. R. Intarface*. 2012. V. 9. № 67. P. 202–221.
- Georgiou M., Golding J.P., Loughlin A.J., Kingham P.J., Phillips J.B. // *Biomaterials*. 2015. V. 37. P. 242–251.
- McGrath A.M., Brochlin M., Kingham P.J., Novikov L.N., Wiberg M., Novikova L.N. // *Neurosci. Lett*. 2012. V. 516. № 2. P. 171–176.
- Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *PLoS One*. 2011. V. 14. № 6. P. e17899.

39. Kim D.Y., Choi Y.S., Kim S.E., Lee J.H., Kim S.M., Kim Y.J., Rhie J.W., Jun Y.J. // *J. Korean. Med. Sci.* 2014. № 3. P. 183–192.
40. Hsueh Y.-Y., Chang Y.J., Huang T.C., Fan S.C., Wang D.H., Chen J.J., Wu C.C., Lin S.C. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 7. P. 2234–2244.
41. Tseng T.C., Hsu S.H. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 9. P. 2630–2641.
42. Marinescu S.A., Zărnescu O., Mihai I.R., Giuglea C., Sinescu R.D. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2014. V. 55. № 3. P. 891–903.
43. Pereira T., Gartner A., Amorim I., Almeida A., Caseiro A.R., Armada-da-Silva P.A., Amado S., Fregnan F., Varejro A.S., Santos J.D., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 302659.
44. Li Y., Guo L., Ahn H.S., Kim M.H., Kim S.W. // *J. Cell. Mol. Med.* 2014. V. 18. № 6. P. 1028–1034.
45. Stagg J., Galipeau J. // *Curr. Mol. Med.* 2013. V. 13. № 5. P. 856–867.
46. Рубцов Ю.П., Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 1. С. 24–33.
47. Айзенштадт А.А., Иванова Н.А., Багаева В.В., Смолянинов А.Б., Пиневич А.А., Самойлович М.П., Климович В.Б. // *Цитология.* 2014. Т. 56. № 2. С. 117–122.
48. Земелько В.И., Кожухарова И.В., Алексеенко Л.Л., Домнина А.П., Решетникова Г.Ф., Пузанов М.В., Дмитриева Р.И., Гринчук Т.М., Никольский Н.И., Анисимов С.В. // *Цитология.* 2013. Т. 55. № 2. С. 101–110.
49. Han C., Zhang L., Song L., Liu Y., Zou W., Piao H., Liu J. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2014. V. 127. № 2. P. 329–337.
50. Тюрин-Кузьмин П.А., Воротников А.В., Ткачук В.А. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2013. Т. 99. № 3. С. 294–312.
51. Cartarozzia L.P., Spejo A.B., Ferreira R.S., Barravierab B., Duek E., Carvalhad G.L., Goes A.M., Oliveiraa A.L.R. // *Brain Res. Bull.* 2015. V. 112. P. 14–24.
52. Lerner M.Z., Matsushita T., Lankford K.L., Radtke C., Kocsis J.D., Young N.O. // *Laryngoscope.* 2014. V. 124. № 11. P. 2555–2560.
53. Lin S., Xu L., Hu S., Zhang C., Wang Y., Xu J. // *Muscle Nerve.* 2013. V. 47. № 2. P. 194–201.
54. Thomas C.K., Erb D.E., Grumbles R.M., Bunge R.P. // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. № 1. P. 591–595.
55. Franchi S., Valsecchi A.E., Borsani E., Procacci P., Zaffa C., Sartori P., Rodella L.F., Vescovi A., Maione S., Rossi F., et al. // *Pain.* 2012. V. 153. № 4. P. 850–861.
56. Wang A., Tang Z., Park I.H., Zhu Y., Patel S., Daley G.Q., Li S. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 22. P. 5023–5032.
57. Uemura T., Takamatsu K., Ikeda M., Okada M., Kazuki K., Ikada Y., Nakamura H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 419. № 1. P. 130–135.
58. Ikeda M., Uemura T., Takamatsu K., Okada M., Kazuki K., Tabata Y., Ikada Y., Nakamura H. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014. V. 102. № 5. P. 1370–1378.
59. Kuo Y.C., Lin C.C. // *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 2013. V. 1. № 103. P. 595–600.
60. Okawa T., Kamiya H., Himeno T., Kato J., Sieno Y., Fujiya A., Kondo M., Tsunekawa S., Naruse K., Hamada Y., et al. // *Cell Transplant.* 2013. V. 22. № 10. P. 1767–1783.
61. Байкова Ю.П., Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б., Бухарова Т.Б., Дубовая Т.К., Кактурский Л.В., Гольдштейн Д.В. // *Клет. техн. биол. мед.* 2011. № 3. С. 140–146.
62. Lavasani M., Pollett J.B., Usas A., Thompson S.D., Pollett A.F., Huard J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e82173.
63. Tamaki T., Hirata M., Soeda S., Nakajima N., Saito K., Nakazato K., Okada Y., Hashimoto H., Uchiyama Y., Mochida J. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. P. e91257.
64. Охотин В.Е., Ревизиц А.В., Павлова Г.В. // *Тихоокеанский мед. журн.* 2012. № 2. С. 60–65.
65. Frattini F., Lopes F.R., Almeida F.M., Rodrigues R.F., Boldrini L.C., Tomaz M.A., Baptista A.F., Melo P.A., Martinez A.M. // *Tissue Eng. Part A.* 2012. V. 18. № 19–20. P. 2030–2039.
66. Orbay H., Uysal A.C., Hyakusoku H., Mizuno H. // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2012. V. 65. № 5. P. 657–664.
67. Wang Y., Zhao Z., Ren Z., Zhao B., Zhang L., Chen J., Xu W., Lu S., Zhao Q., Peng J. // *Neurosci Lett.* 2012. V. 514. № 1. P. 96–101.
68. Suganuma S., Tada K., Hayashi K., Takeuchi A., Sugimoto N., Ikeda K., Tsuchiya H. // *J. Orthop. Sci.* 2013. V. 18. № 1. P. 145–151.
69. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. // *Acta Naturae.* 2011. Т. 3. № 4. С. 32–39.
70. Reid A.J., Sun M., Wiberg M., Downes S., Terenghi G., Kingham P.J. // *Neuroscience.* 2011. V. 199. P. 515–522.
71. Ribeiro-Resende V.T., Carrier-Ruiz A., Lemes R.M.R., Reis R.A.M., Mendez-Otero R. // *Mol. Neurodegeneration.* 2012. V. 7. P. 34.
72. Ефименко А.Ю., Джояшвили Н.А., Калинина Н.И., Кочегура Т.Н., Ачкурин П.С., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 7. № 4. С. 73–82.
73. Mantovani C., Terenghi G., Magnaghi V. // *Neural Regen. Res.* 2014. V. 9. № 1. P. 10–15.
74. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. *Периферическая нервная система.* СПб.: Наука, 1999. 281 с.
75. Sta M., Cappaert N.L., Ramekers D., Baas F., Wadman W.J. // *J. Neurosci. Methods.* 2014. V. 222. P. 189–198.
76. Wang J., Ding F., Gu Y., Liu J., Gu X. // *Brain Res.* 2009. V. 1262. P. 7–15.
77. Xu L., Zhou S., Feng G.Y., Zhang L.P., Zhao D.M., Liu Q., Huang F. // *Mol. Neurobiol.* 2012. V. 46. P. 265–274.
78. Берснев В.П., Яковенко И.В., Семенютин В.Б., Козин Г.С. *Хирургическое лечение поврежденных нервов с учетом их кровотока и данных интраоперационной диагностики.* Л.: Изд-во Рос. научно-иссл. нейрохирургического института им. А.Л. Поленова, 1991. 30 с.
79. Kingham P.J., Kolar M.K., Novikova L.N., Novikov L.N., Wiberg M. // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 7. P. 741–754.
80. Hsu S.H., Kuo W.C., Chen Y.T., Yen C.T., Chen Y.F., Chen K.S., Huang W.C., Cheng H. // *Acta Biomater.* 2013. V. 9. № 5. P. 6606–6615.
81. Salgado A.J., Reis R.L., Sousa N.J., Gimble J.M. // *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.* 2010. V. 5. № 2. P. 103–110.
82. Kuffler D.P. // *Prog. Neurobiol.* 2014. V. 116. P. 1–12.
83. Ramburrin P., Kumar P., Choonara Y.E., Bijukumar D., du Toit L.C., Pillay V. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 132350.
84. Nectow A.R., Marra K.G., Kaplan D.L. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2012. V. 18. № 1. P. 40–50.
85. Ladak A., Olson J., Tredget E.E., Gordon T. // *Exp. Neurol.* 2011. V. 228. № 2. P. 242–252.
86. Cunha A.S., Costa M.P., Silva C.F. // *Acta Cir. Bras.* 2013. V. 28. № 2. P. 94–101.
87. Liao I.C., Wan H., Qi S., Cui C., Patel P., Sun W., Xu H. // *J. Tissue Eng.* 2013. № 4. P. 2041731413481036.
88. Jia H., Wang Y., Tong X.J., Liu G.-B., Li Q., Zhang L.X., Sun X.H. // *Synapse.* 2012. V. 66. № 3. P. 256–269.
89. Khuong H.T., Kumar R., Senjaya F., Grochmal J., Ivanovic A., Shakhbazov A., Forden J., Webb A., Biernaskie J., Midha R. // *Exp. Neurol.* 2014. V. 254. P. 168–179.
90. Dai L.G., Huang G.S., Hsu S.H. // *Cell Transplantation.* 2012. V. 22. № 11. P. 2029–2039.
91. Shen C.C., Yang Y.C., Liu B.S. // *J. Biomed. Materials Res.* 2013. V. 101. № 1. P. 239–252.

92. Yang C.C., Wang J., Chen S.C., Hsieh Y.L. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. doi: 10.1002/term.1714.
93. Luo H., Zhang Y., Zhang Z., Jin Y. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 17. P. 4277–4287.
94. Zhu F.B., Liu D.W., Zhang H.Y., Xu J.C., Peng Y., Zhong Q.L., Li Y.T. // *Zhonghua. Shao. Shang. Za. Zhi.* 2012. V. 28. № 1. P. 25–31.
95. Wang Y., Jai H., Li W.Y., Tong X.J., Liu G.B., Kang S.W. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012. V. 32. № 3. P. 361–371.
96. Marinescu S.A., Zrnescu O., Mihai I.R., Giuglea C., Sinescu R.D. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2014. V. 55. № 3. P. 891–903.
97. Jonsson S., Wiberg R., McGrath A.M., Novikov L.N., Wiberg M., Novikova L.N., Kingham P.J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. e56484.
98. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Рагинов И.С., Маломуж А.И., Нигметзянова М.В., Челышев Ю.А. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2009. № 2. С. 103–104.
99. Liu Y., Nie L., Zhao H., Zhang W., Zhang Y.Q., Wang S.S., Cheng L. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10. P. e110993.
100. Duan X.H., Cheng L.N., Zhang F., Liu J., Guo R.M., Zhong X.M., Wen X.H., Shen J. // *Eur. J. Radiol.* 2012. V. 81. № 9. P. 2154–2160.
101. Liao C.D., Zhang F., Guo R.M., Zhong X.M., Zhu J., Wen X.H., Shen J. // *Radiology.* 2012. V. 262. № 1. P. 161–171.
102. Li K., Qin J., Wang X., Xu Y., Shen Z., Lu X., Zhang G. // *Cytotherapy.* 2013. V. 15. № 10. P. 1275–1285.
103. Угрюмов М.В., Коновалов А.Н., Гусев Е.И. // *Вестник РАМН.* 2004. № 11. С. 8–17.
104. Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. // *Морфология.* 2006. Т. 130. № 6. С. 84–88.
105. Barmade-Heider F., Frisen J. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. № 1. P. 16–24.
106. Анисимов С.В. // *Успехи геронтол.* 2009. Т. 22. № 3. С. 418–439.
107. Лосева Е.В. // *Нейрокомпьютеры: разработка, применение.* 2013. № 7. С. 32–44.
108. Попов Б.В. *Клеточные механизмы регенеративного потенциала мезенхимных стволовых клеток, роль семейства продукта гена ретинобластомы.* СПб.: ИЦ РАН, 2014.
109. Keilhoff G., Fansa H. // *Exp. Neurology.* 2011. V. 232. № 3. P. 110–113.
110. Pan Y., Cai S. // *Mol. Cell Biochem.* 2012. V. 368. № 1–2. P. 127–135.
111. Hu N., Wu H., Xue C., Gong Y., Wu J., Xiao Z., Yang Y., Ding F., Gu X. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 1. P. 100–111.
112. Klopp A.H., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M., Marini F. // *Stem Cells.* 2011. V. 29. № 1. P. 11–19.
113. Castellone M.D., Laatikainen L.E., Laurila J.P., Langella A., Hematti P., Soricelli A., Salvatore M., Laukkanen M.O. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 6. P. 1218–1223.
114. Tian L.L., Yue W., Zhu F., Li S., Li W. // *J. Cell. Physiol.* 2011. V. 226. № 7. P. 1860–1867.
115. Чистякова И.А., Полянская Г.Г. // *Цитология.* 2014. Т. 56. № 11. С. 801–808.
116. Shi W., Yao J., Chen X., Lin W., Gu X., Wang X. // *Artif. Cells Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.* 2010. V. 38. № 1. P. 29–37.
117. Лосева Е.В., Подгорный О.В., Полтавцева Р.А., Марей М.В., Логинова Н.А., Курская О.В., Сухих Г.Т., Чайлахян Р.К., Александрова М.А. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2011. Т. 97. № 2. С. 155–168.
118. Braga-Silva J., Gehlen D., Padoin A.V., Machado D.C., Gari-cochea B., Costa da Costa J. // *J. Hand. Surg. Eur.* 2008. V. 33. № 4. P. 488–493.
119. Салафутдинов И.И., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Ризванов А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Богов А.А. *Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под ред. В.А. Ткачука. М.: Махс-пресс, 2012. С. 70–71.*
120. Li Z., Qin H., Feng Z., Liu W., Zhou Y., Yang L., Zhao W., Li Y. // *Neural. Regen. Res.* 2013. V. 8. № 36. P. 3441–3448.
121. Бойко Э.В., Бисага Г.Н., Коваленко А.В., Исаева Г.Е., Коваленко И.Ю., Новицкий А.В., Букин С.В. // *Вест. Рос. военно-мед. академии.* 2014. № 3. С. 12–18.
122. Widgerow A.D., Salibian A.A., Lalezari S., Evans G.R. // *J. Neurosci. Res.* 2013. V. 19. № 12. P. 1517–1524.

УДК 577.113;577.123

Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике

О. Е. Брызгунова^{1*}, П. П. Лактионов^{1,2}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

*E-mail: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 29.10.2014

После доработки 19.05.2015

РЕФЕРАТ Внеклеточные нуклеиновые кислоты (внНК) могут появляться в моче в результате некроза и апоптоза клеток, а также активной секреции нуклеиновых кислот здоровыми и опухолевыми клетками мочеполового тракта, транспорта циркулирующих нуклеиновых кислот (цирНК) крови в первичную мочу. ДНК и РНК мочи фрагментированы, однако они могут использоваться для выявления маркерных последовательностей. МикроРНК также представляют интерес в качестве диагностического материала. Стабильность внНК определяется их структурой, упаковкой в надмолекулярные комплексы и активностью нуклеаз в моче. В обзоре описаны возможные источники, особенности строения внНК мочи, диагностическое использование внНК и факторы, влияющие на их стабильность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активная секреция, апоптоз, внеклеточная ДНК и РНК мочи, неинвазивная диагностика, некроз, нуклеазы мочи.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ внДНК – внеклеточные ДНК; внНК – внеклеточные нуклеиновые кислоты; внРНК – внеклеточные РНК; НК – нуклеиновые кислоты; цирНК – циркулирующие нуклеиновые кислоты.

ИСТОЧНИКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МОЧИ (РИСУНОК)

Внеклеточные нуклеиновые кислоты (НК) могут появляться в моче в результате транспорта внНК крови через почки и непосредственно из клеток, контактирующих с этой биологической жидкостью. Механизмы генерации и общие свойства внеклеточных или циркулирующих НК крови суммированы в обзорах [1, 2]. Считается, что основной источник внНК – апоптоз клеток. В крови НК циркулируют в составе комплексов с биополимерами и могут быть упакованы в мембранные структуры [1, 3]. Циркулирующая ДНК сильно фрагментирована, а размер фрагментов пропорционален нуклеосоме [1]. В крови обнаруживаются как мРНК, рибосомная РНК, так и некодирующие РНК, микроРНК, которые могут циркулировать как в составе нуклеопротеиновых комплексов, так и в составе покрытых мембранами микрочастиц, в том числе экзосом [4–6]. Транспорт нуклеиновых кислот из крови в первичную мочу подразумевает транспорт компонентов из приносящей артерии в полость почечного тельца.

Отвечающая за этот процесс клубочковая фильтрация веществ из плазмы крови ограничена проницаемостью базальной мембраны и щелевых мембран между «ножками» подоцитов. Так, в просвет нефрона могут проходить комплексы диаметром не более 6.4 нм [7] и молекулярной массой не более 70 кДа [8], что соответствует ДНК размером около 100 п.н. Размер пор гломерулярного барьера равен примерно 30 Å, хотя обнаружены и шунтоподобные поры радиусом 110–115 Å, однако их количество очень мало [9]. Важную роль в прохождении веществ через юкстагломерулярный аппарат играют отрицательно заряженные молекулы: полианионы, входящие в состав базальной мембраны, и сиалогликопротеины в выстилке, лежащей на поверхности подоцитов и между их «ножками» [7]. Как известно, ДНК [10–12] и РНК [13–15] в крови находятся преимущественно в составе надмолекулярных комплексов, таких, как нуклеосомы [1], комплексы РНК с липопротеинами крови [16, 17], или более крупных, защищенных мембраной микрочастиц и экзосом [4] или апоптотических телец. Однако размер мононуклеосомы превышает просвет



Источники внеклеточных нуклеиновых кислот крови и мочи

даже самых больших пор почечного барьера и, поэтому, в своей классической конфигурации мононуклеосомы пройти сквозь барьер не могут.

На транспорт молекул нуклеиновых кислот из крови может влиять и общее состояние здоровья пациента. Еще в 1967 году обнаружили увеличение количества ДНК в моче больных острым панкреатитом [18], а в 2012 году показали, что моча курящих людей содержит больше ДНК, чем моча некурящих (9.46 и 9.04 нг/мкл – у женщин соответственно; 4.96 и 2.93 нг/мкл – у мужчин соответственно) [19]. Эксперименты, проведенные на мышах, показали, что действительно часть ДНК гибнущих клеток, введенных внутривентриально, избегает внутриклеточной деградации и фагоцитоза и циркулирует в крови в форме полимеров, а также частично выводится с мочой в виде кислотонерастворимой формы [20].

Изучение продуктов деградации меченой [³²P] ДНК фага λ, введенной в брюшную полость мыши,

показало, что большая часть этих продуктов используется клетками повторно или гидролизуется до кислоторастворимых фрагментов, только ~3.2% выводится с мочой в течение 3 дней. Небольшая часть введенной ДНК (0.06%) появляется в кислотонерастворимой фракции нуклеиновых кислот мочи (длинной ≥15–20 п.н.).

Необходимо обратить внимание и на тот факт, что выведение «незащищенных», очищенных от примесей ДНК/РНК и ДНК/РНК из умирающих клеток может быть различным. Некротическая и тем более апоптотическая ДНК связана с белками и защищена от нуклеаз несравненно лучше, чем чистая ДНК, используемая в модельной системе. При этом ДНК/РНК-связывающие белки могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на транспорт ДНК/РНК через почечный барьер. В пользу этих предположений может свидетельствовать и то, что в моче мышей, в брюшную полость которых вве-

ли клетки лимфомы человека Raji, апоптоз в которых был индуцирован γ -излучением, обнаружены человеческие Alu-последовательности, отсутствующие в моче контрольных животных (не получавших инъ-екции клеток Raji) [20].

Другое доказательство транспорта циркулирующей ДНК крови в мочу – специфические ДНК Y-хромосомы, обнаруженные в моче женщин, которым перелили кровь доноров-мужчин [20]. Кроме того, в моче женщин, вынашивающих плод мужского пола, также обнаружены специфические ДНК Y-хромосомы [20, 21]. При этом показано, что эмбриональная ДНК в моче матери значительно короче, чем в плазме ее крови [21]. Еще одно подтверждение транспорта полимерной ДНК из крови в мочу получено при анализе вДНК онкологических больных. Известно, что в 80–90% опухолей поджелудочной железы и кишечника обнаруживаются мутантные формы гена *K-ras*, найденные Botezatu и соавт. [20] в составе внеклеточных ДНК в моче больных раком поджелудочной железы (стадия IV) и кишечника (стадии III–IV). Концентрация опухолевой ДНК в моче достаточно высока – мутантный ген *K-ras* обнаружен во вДНК мочи у пяти из восьми больных раком поджелудочной железы и у четырех из пяти больных раком кишечника [20]. Возможность поступления ДНК в мочу из крови доказывают результаты опытов по выявлению в моче больных туберкулезом ДНК *Mycobacterium tuberculosis* [22, 23].

Таким образом, встречающиеся в крови фрагменты ДНК размером 50–100 п.н., по-видимому, частично защищенные гистонами, тем не менее, потенциально могут проникать в мочу из крови. Кроме того, высказано предположение, что связывание ДНК с гистонами, например с H3K27me2, может способствовать экспорту внеклеточной ДНК [24].

Очевидно, что еще одним и, по-видимому, основным источником вДНК и вРНК в моче является апоптоз/некроз клеток мочеполового тракта. Действительно, в норме за сутки в мочу может попадать до 3×10^6 клеток эпителия мочевого пузыря и мочевыводящих путей (подсчет по методу Каковского–Аддиса) [25]. Очевидно, что эти клетки и клетки эндотелия частично могут вступать в апоптоз, и фрагментированная апоптотическая ДНК/РНК из этих клеток неизбежно будет попадать в мочу [20]. Действительно, после трансплантации женщинам почек от доноров мужчин концентрация Y-хромосомной ДНК в моче увеличивается при развитии отторжения и возвращается к нормальному уровню при ингибировании иммунной реакции против трансплантата [26–28]. Во внеклеточной ДНК мочи при помощи MALDI-TOF-масс-спектрометрии также обнаружены SNP-аллели донорной почки [29].

Во внеклеточной ДНК мочи больных раком мочеполовой системы выявлены мутации и микросателлитные нарушения, характерные для злокачественных опухолей почки [30] и мочевого пузыря [31–33], абберрантно метилированные ДНК, характерные для опухолей предстательной железы [34, 35] и мочевого пузыря [33, 36–40]. В моче больных с гинекологическими, урологическими заболеваниями или с ВИЧ-инфекцией присутствует ДНК папилломавируса, который поражает глубокие слои кожи и слизистые оболочки внутренних органов [41]. При раке мочевого пузыря во внеклеточной ДНК мочи обнаруживаются последовательности не только геномной, но и митохондриальной ДНК [42].

Концентрация РНК в моче человека составляет 20–140 нг/мл [43, 44]. Доказательством того, что вРНК в моче появляется в результате апоптоза/некроза клеток мочеполового тракта, может служить обнаружение в моче больных раком мочевого пузыря и пациентов с инфекциями мочевыводящих путей мРНК сурвирин, цитокератина 20, муцина 7 и Ki-67 [45, 46]. Данные о транспорте циркулирующей РНК из крови в мочу нам обнаружить не удалось.

Строго говоря, данные о присутствии в моче онко/плодоспецифических НК не позволяют получить прямой ответ на вопрос о том, какая часть вНК образуется за счет апоптоза/некроза клеток, выстилающих мочеполовые пути (следует отметить, что клетки простатического происхождения составляют не более 10% от суммарного пула клеток мочи [47]). Данные о концентрации опухолеспецифических НК в моче и крови больных онкологическими заболеваниями мочеполовой системы свидетельствуют о том, что транспорт опухолеспецифических вНК из крови не является процессом, определяющим концентрацию этих вНК в моче. Действительно, метилированные формы генов *GSTP1* и *RASSF1A* обнаруживаются в моче 15 и 65% больных раком почки и в крови 6 и 11% пациентов соответственно [48], т.е. эти маркерные ДНК не могут поступать из крови в мочу, а, скорее всего, транспортируются непосредственно в мочу. На основании этих и ряда других [49, 50] данных можно уверенно утверждать, что при онкологических заболеваниях мочеполового тракта основная доля онкоспецифических внеклеточных НК поступает в мочу не из крови, а, по-видимому, непосредственно при попадании опухолевых клеток или продуктов их распада в мочевыводительные пути либо в результате диффузии через ткани почки.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И СОСТАВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МОЧИ

По размеру фрагментов вДНК мочи можно условно поделить на две группы: гетерогенная высокомоле-

кулярная (1 т.п.н. и выше) и относительно гомогенная низкомолекулярная ДНК (150–250 п.н.) [20, 43, 51, 52]. В моче обнаружена также низкомолекулярная ДНК размером 10–150 и 150–200 п.н. [53].

Изучению ДНК и РНК бесклеточной фракции мочи посвящены отдельные работы, тогда как в основной массе исследований проводится поиск онкоспецифических маркеров в суммарной моче или только в клетках мочи. В составе вДНК обнаружены практически такие же изменения, характерные для опухолевых ДНК, как и в ДНК, циркулирующих в крови, а именно, точечные мутации, нарушения состава микросателлитов, характерный профиль метилирования онкогенов, присутствие вирусной ДНК [30, 33, 36, 41].

ДНК-маркеры анализировали преимущественно методом ПЦР. Микросателлитные перестройки (в одном или нескольких из 28 маркеров: D1S251, HTPO, D3S1317, D3S587, D3S1560, D3S1289, D3S1286, D3S1038, D4S243, FGA, CSF, АСТВР2, D8S348, D8S307, D9S747, D9S242, IFNa, D9S162, D11S488, THO, vWA, D13S802, MJD, D17S695, D17S654, D18S51, MBP, D21S1245) обнаружены в моче 76% больных с опухолями почек [30]. Хотя бы одно из нарушений микросателлитной ДНК (D4S243, D9S747, D9S171, D17S695, D17S654) обнаружено у 27% больных с опухолями мочевого пузыря [31].

Внеклеточные ДНК с мутациями в гене *FGFR3* обнаружены в моче 34.5% больных раком мочевого пузыря [33], *P53* – у 52.9% больных раком печени [54], *K-ras* – у 95% больных раком кишечника [55].

Аберрантно метилированные ДНК, характерные для клеток опухолей предстательной железы (ген *GSTP1*), найдены в моче 36% больных раком предстательной железы [34, 56] и у 3.2% лиц с доброкачественной гиперплазией предстательной железы [35]. Изменения метилирования обнаружены в ряде генов вДНК мочи больных раком мочевого пузыря: *CDKN2A* (46.7%), *ARF* (26.7%), *GSTP1* (46.7%), *MGMT* (26.7%), *RARβ2* (60%), *TIMP3* (46.7%), *CDH1* (66.7%), *RASSF1A* (53%) и *APC* (53%) [37]. Кроме того, определение статуса метилирования одновременно четырех генов: *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *SOX11* или *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, вДНК мочи позволяет детектировать рак мочевого пузыря с высокой чувствительностью (81.3%) и специфичностью (97.3%), а определение статуса метилирования одновременно пяти генов: *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, *SOX11* или *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, *PENK*, позволяет выявлять рак мочевого пузыря с чувствительностью 85.2% и специфичностью 94.5% [40].

В моче женщин с патологиями шейки матки ДНК папилломавируса человека типа 16 была обнаружена у 88.8% больных раком, 76.5% пациенток, имею-

щих поражения высокой степени, и у 45.5% больных с поражениями низкой степени [57]. В моче больных раком предстательной железы, получивших хирургическое лечение, папилломавирусная ДНК обнаружена в 50% случаев [58].

Что касается маркерной внеклеточной РНК, то у двух из четырех больных раком мочевого пузыря и у двух из четырех пациентов с инфекциями мочевыводящих путей при помощи количественной ОТ-ПЦР обнаружена специфическая мРНК *Ki-67*, не найденная в моче пяти здоровых доноров [46]. Кроме того, методом ОТ-ПЦР в моче больных раком мочевого пузыря обнаружены мРНК сурвирина (чувствительность 90.4%, специфичность 94.7%), цитоцератина 20 (чувствительность 82.6%, специфичность 97.4%) и муцина 7 (чувствительность 62.6%, специфичность 94.7%) ($P < 0.001$). Комбинация этих трех маркеров позволяет выявлять рак мочевого пузыря с чувствительностью 100% при специфичности анализа 89.5% [45].

Определение концентрации мРНК *CD147*, *BIGH3*, *STMN1* в бесклеточном супернатанте мочи (после центрифугирования суммарной мочи при 10000 об/мин) показало, что у пациентов с уротелиальным раком мочевого пузыря концентрация этих мРНК в 2–67 раз выше, чем у здоровых доноров [59].

Перспективный маркер, специфически экспрессирующийся при раке предстательной железы, – мРНК *AMACR* (α -methylacyl coenzyme A racemase). Детекция мРНК *AMACR* в осадке мочи 92 мужчин, из которых у 43 диагностирован рак предстательной железы, позволяет выявлять больных с чувствительностью 70% и специфичностью 71%, тогда как определение мРНК *PCSA3* обеспечивает чувствительность 72% и специфичность 59% [60]. Одновременное определение мРНК *AMACR* и *PCSA3* повышает чувствительность и специфичность теста до 81 и 84% соответственно.

Анализ соотношения мРНК *ETS2* (v -ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) и мРНК *uPA* (urokinase plasminogen activator) во внеклеточной РНК в суммарной моче (без центрифугирования/осаждения клеток) позволил диагностировать рак мочевого пузыря со 100% специфичностью и 75.4% чувствительностью [61].

Однако использование мРНК мочи для разработки систем диагностики различных заболеваний до сих пор представляет довольно сложную задачу, поскольку моча содержит большое количество нуклеаз, в том числе и РНКаз (их разнообразие описано в следующей главе). Высокая концентрация ферментов, гидролизующих РНК, осложняет работу с внеклеточными РНК, в том числе и на стадии выделения. В отличие от длинных молекул мРНК, микроРНК

более устойчивы к атакам нуклеаз в связи со своим небольшим размером (20–25 нуклеотидов), способностью формировать прочные комплексы с биополимерами или упаковываться в различные микро-частицы, например, экзосомы [4]. Действительно в моче обнаружены m-, sca-, sno-, sn-, pi-, miРНК, в том числе и в составе экзосом [4, 62]. Основываясь на этих данных, все больше исследователей пытаются разработать тест-системы для диагностики различных онкологических заболеваний путем анализа микроРНК в моче.

Так, например, показано, что соотношение концентрации микроРНК-126 и микроРНК-152 в моче позволяет обнаружить рак мочевого пузыря со специфичностью 82% и чувствительностью 72% [63]. Определение концентраций микроРНК-210, -10b и -183 повышает специфичность детекции рака мочевого пузыря до 91% при чувствительности не менее 71% [64].

В моче здоровых доноров, онкологических больных и беременных женщин обнаружено более 204 микроРНК, отличающихся в этих группах, часть из которых может быть потенциальными маркерами (например, miR-515-3p, 335, 892a, 509-5p, 223*, 873, 302d, 616*, 134) [44].

Обнаружено, что уровень экспрессии микроРНК 483-5p в бесклеточной фракции мочи статистически значимо повышен (критерий Манна–Уитни, $P = 0.013$) при раке предстательной железы [65].

Исследование микроРНК, относящихся к эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT, epithelial-mesenchymal transition) [66], в осадке и супернатанте мочи у 51 больного раком мочевого пузыря и 24 здоровых доноров выявило уменьшение количества семейства микроРНК-200, микроРНК-192 и -155 в осадке, а также снижение экспрессии микроРНК-192 и повышение экспрессии микроРНК-155 в супернатанте мочи больных. Кроме того, уровень экспрессии семейства микроРНК-200, микроРНК-205 и микроРНК-192 в осадке мочи больных статистически значимо коррелировал с экспрессией маркеров EMT в моче, включая mРНК E-боксысвязывающего гомеобокса 1 с цинковыми пальцами (zinc finger E-box-binding homeobox 1), виментина, трансформирующего фактора роста 1 и гена гомолога семейства Ras (член A). Обнаружено, что уровни микроРНК-200с и микроРНК-141 в осадке мочи больных нормализуются после удаления опухоли мочевого пузыря.

ДНК- И РНК-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ МОЧИ

Моча человека представляет собой подходящую среду для функционирования НК-гидролизующих ферментов: суточная моча взрослого человека содержит 2.0–4.0 г калия, 100–400 мг кальция, 50–150 мг маг-

ния, 3–6 г натрия, 270–850 мкг цинка [25], величина рН мочи в норме варьирует от 5.0 до 7.0.

Основным ДНК-гидролизующим ферментом в моче, как и в крови [1], является ДНКазы I [67–70], причем ее активность в моче превышает активность в сыворотке крови более чем в 100 раз [71] и составляет 400÷1200 ед. акт./л (удельная активность ДНКазы I – 2000 ед. акт./мг, в крови 4.4 ± 1.8 ед. акт./л). Внеклеточную ДНК в моче могут гидролизовать все изоформы ДНКазы I, которые, как известно, отличаются по значению рI, первичной структуре и/или по содержанию сиаловой кислоты [72]. Кроме того, сообщалось о генетическом полиморфизме ДНКазы I в моче [69]. На мышинной модели показано, что концентрация ДНКазы I в моче может значительно повышаться при развитии системной красной волчанки (от 24 до 521 нг/мл), тем самым косвенно отражая нарушения, происходящие в организме [73]. В крови активность ДНКазы I ингибируется актином [68, 74, 75], однако в моче концентрация актина, по-видимому, существенно ниже, чем в крови (концентрацию актина определяют по концентрации 3-метилгистидина, специфического метаболита актина и миозина) [76].

ДНКазы II [70, 71, 77] также обнаруживаются в моче. Активность ДНКазы II в моче человека приблизительно в 30 раз ниже, чем ДНКазы I [77]. При этом активность этого фермента примерно в 1.5–5 раз выше, чем в крови [78], и составляет примерно 13–40 ед. акт./л мочи.

Наряду с ДНКазы в моче присутствует и фосфодиэстераза I, имеющая рН-оптимум 9.0 (фермент стабилен при рН от 3.0 до 11.0) [71, 79].

Что же касается РНК-гидролизующих ферментов мочи, то, к сожалению, работы по их исследованию велись, в основном, в прошлом веке (70-е–90-е гг.). РНКазы 2 – наиболее представлена в моче человека, где ее примерно в 20 раз больше, чем РНКазы I. Молекулярная масса РНКазы 2, определенная методами электрофореза в SDS-PAGE и гель-фильтрацией, составляет 32 и 38 кДа соответственно, рН-оптимум находится в диапазоне 7.2–7.6 [80].

Рибонуклеаза I (РНКазы I) – второй по представленности РНК-гидролизующий фермент мочи [81]. Молекулярная масса этого фермента составляет ~16 кДа, фермент активен при рН 7.0 и ингибируется ионами Cu^{2+} , Hg^{2+} и Zn^{2+} . РНКазы I является пиримидин-специфичным ферментом, более эффективно гидролизует поли(С) и поли(У), в отличие от поли(А) и поли(Г). Кроме того, РНКазы I способна гидролизовать гетеродуплексы РНК:ДНК [82].

Наряду с РНКазы 2 и I в моче человека обнаружены РНКазы С и U с рН-оптимумами 8.5 и 7.0 соответственно [83], а также РНКазы 7, UL, US, UrI-

1 и UrI-2. РНКазы С (33 кДа) представляет собой гликопротеин, предпочтительно гидролизующий синтетический гомополимер поли(С), аналогичный РНКазам поджелудочной железы млекопитающих. РНКазы U (18 кДа) также является гликопротеином, использует в качестве субстрата РНК, но практически не активна в отношении поли(С) и обладает меньшей гомологией с РНКазой поджелудочной железы. По аминокислотному составу этот фермент сходен с РНКазой селезенки человека. РНКазы с молекулярной массой 33 [84] и 21.5 кДа [85], рН-оптимумом 6.5 и более эффективным гидролизом поли(С) обнаружены в моче человека и другими исследователями. РНКазы 7 (14.5 кДа) присутствует в моче в концентрации 235–3467.2 мг/л [86]. РНКазы 7 проявляет антибактериальную активность при щелочных значениях рН.

Пиримидин-специфичные РНКазы UL (38 кДа) и US (13 кДа), имеющие рН-оптимумы 8.0 и 6.75 соответственно, обнаружены в моче взрослых индивидов [87]. В моче беременных женщин обнаружены РНКазы UrI-1 (34 кДа) и UrI-2 (38 кДа) с рН-оптимумами 7.7 и 6.6 соответственно [88].

Таким образом, внеклеточные ДНК и РНК гетерогенны по своему размеру и составу. В мочу они могут поступать как из крови, так и из клеток мочеполовой системы преимущественно в результате апоптоза, некроза, онкоза и активной секреции (в составе экзосом). Биологические функции внеклеточных нуклеиновых кислот мочи не исследованы, однако ДНК, РНК и малые РНК представляют интерес для ранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний различной этиологии. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bryzgunova O., Laktionov P. // *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomed. Chem.* 2014. V. 8. P. 203–219.
- Fleischhacker M., Schmidt B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1775. P. 181–232.
- van der Vaart M., Pretorius P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 18–26.
- Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A. // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2014. V. 369. P. 20130502.
- Sita-Lumsden A., Fletcher C., Dart D., Brooke G., Waxman J., Bevan C. // *Biomark. Med.* 2013. V. 7. P. 867–877.
- Rykova E., Morozkin E., Ponomaryova A., Loseva E., Zaporozhchenko I., Cherdynseva N., Vlassov V., Laktionov P. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012. V. 12. Suppl 1. P. S141–S153.
- Покровский В., Коротько Г. *Физиология человека. М.: Медицина, 1997. С. 277–280.*
- Lote C. *Principles of Renal Physiology.* London: Chapman & Hall, 1994. P. 33–44.
- Tencer J., Frick I., Oquist B., Alm P., Rippe B. // *Kidney Int.* 1998. V. 53. P. 709–715.
- Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., von Pawel J., Schalhorn A., Nagel D., Seidel D. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 93–102.
- Kiroi K., Tanaka C., Toi M. // *Breast Cancer.* 1999. V. 6. P. 361–364.
- Lin J., Fan R., Zhao Z., Cummings O., Chen S. // *Am. J. Surg. Pathol.* 2013. V. 37. P. 539–547.
- Ng E., Tsui N., Lam N., Chiu R., Yu S., Wong S., Lo E., Rainer T., Johnson P., Lo Y. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. P. 1212–1217.
- Halicka H., Bedner E., Darzynkiewicz Z. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 260. P. 248–256.
- Hasselmann D., Rappl G., Tilgen W., Reinhold U. // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. P. 1488–1489.
- Gahan P., Stroun M. // *Cell Biochem. Funct.* 2010. V. 28. P. 529–538.
- Vickers K., Palmisano B., Shoucri B., Shamburek R., Remaley A. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. P. 423–433.
- Sorenson G. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 2129–2137.
- Simkin M., Abdalla M., El-Mogy M., Haj-Ahmad Y. // *Epigenomics.* 2012. V. 4. P. 343–352.
- Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelerov V., Alechina R., Molyaka Y., Anan'ev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M., et al. // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. P. 1078–1084.
- Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M., Matsuoka R., Honma S., Farina A., Saito H., Okai T. // *Prenatal Diagnosis.* 2005. V. 25. P. 604–607.
- Tuuminen T. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 1–6.
- Peter J., Green C., Hoelscher M., Mwaba P., Zumla A., Dheda K. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2010. V. 16. P. 262–270.
- Peters D., Pretorius P. // *Clin. Chim. Acta.* 2011. V. 412. P. 806–811.
- Чиркин А., Окоороков А., Гончарик И. *Диагностический справочник терапевта.* Минск, 1993. 688 с.
- Zhang J., Tong K., Li P., Chan A., Yeung C., Pang C., Wong T., Lee K., Lo D. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. P. 1741–1746.
- Zhong X., Hahn D., Troeger C., Klemm A., Stein G., Thomson P., Holzgreve W., Hahn S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 250–257.
- Zhang Z., Ohkohchi N., Sakurada M., Mizuno Y., Miyagi T., Satomi S., Okazaki H. // *Transplantation Proc.* 2001. V. 33. P. 380–381.
- Li Y., Hanh D., Wenzel W., Hanh S., Holzgreve F. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1075. P. 144–147.
- Eisenberger C., Schoenberg M., Enger C., Hortopan S., Shah S., Chow N., Marshall F., Sidransky D. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1999. V. 91. P. 2028–2032.
- Utting M., Werner W., Dahse R., Schubert J., Junker K. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. P. 35–40.
- Mao L., Lee D., Tockman M., Erozan Y., Askin F., Sidransky D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 9871–9875.
- Karnes R., Fernandez C., Shuber A. // *Mayo Clin. Proc.* 2012. V. 87. P. 835–839.
- Goessl C., Krause H., Muller M., Heicappell R., Schrader M., Sachsinger J., Miller K. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 5941–5945.
- Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Urology.* 2002. V. 60. P. 1131–1135.
- Goessl C., Muller M., Straub B., Miller K. // *Eur. Urology.* 2002. V. 41. P. 668–676.
- Hoque M., Begum S., Topaloglu O., Chatterjee A., Rosenbaum E., Crikings W., Westra W., Schoenberg M., Zahurak

- M., Goodman S., Sidransky D. // *J. Nat. Cancer Inst.* 2006. V. 98. P. 996–1004.
38. Reinert T., Modin C., Castano F., Lamy P., Wojdacz T., Hansen L., Wiuf C., Borre M., Dyrskjot L., Orntoft T. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. P. 5582–5592.
39. Reinert T. // *Adv. Urol.* 2012. V. 2012. P. 503271.
40. Chung W., Bondaruk J., Jelinek J., Lotan Y., Liang S., Czerniak B., Issa J. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011. V. 20. P. 1483–1491.
41. Vorsters A., Micalessi I., Bilcke J., Ieven M., Bogers J., van Damme P. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. V. 31. P. 627–640.
42. Ziegler A., Zangemeister-Wittke U., Stahel R. // *Cancer Treatment Rev.* 2002. V. 28. P. 255–271.
43. Bryzgunova O., Skvortsova T., Kolesnikova E., Starikov A., Rykova E., Vlassov V., Laktionov P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1075. P. 334–340.
44. Weber J., Baxter D., Zhang S., Huang D., Huang K., Lee M., Galas D., Wang K. // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. P. 1733–1741.
45. Pu X., Wang Z., Chen Y., Wang X., Wu Y., Wang H. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008. V. 134. P. 659–665.
46. Menke T., Warnecke J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1022. P. 185–189.
47. Truong M., Yang B., Jarrard D. // *J. Urology.* 2013. V. 189. P. 422–429.
48. Hoque M., Begum S., Topaloglu O., Jeronimo C., Mambo E., Westra W., Califano J., Sidransky D. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 5511–5517.
49. Payne S., Serth J., Schostak M., Kamradt J., Strauss A., Thelen P., Model F., Day J., Liebenberg V., Morotti A., et al. // *Prostate.* 2009. V. 69. P. 1257–1269.
50. Goessl C., Muller M., Heicappell R., Krause H., Miller K. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 51–58.
51. Su Y., Wang M., Brenner D., Ng A., Melkonyan H., Umansky S., Syngal S., Block T. // *J. Mol. Diagn.* 2004. V. 6. P. 101–107.
52. Su Y., Wang M., Aiampitumrit B., Brenner D., Block T. // *Cancer Biomarkers.* 2005. V. 1. P. 177–182.
53. Melkonyan H., Feaver W., Meyer E., Scheinker V., Shekhtman E., Xin Z., Umansky S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 73–81.
54. Lin S., Dhillon V., Jain S., Chang T., Hu C., Lin Y., Chen S., Chang K., Song W., Yu L., et al. // *J. Mol. Diagn.* 2011. V. 13. P. 474–484.
55. Su Y., Wang M., Brenner D., Norton P., Block T. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 197–206.
56. Bryzgunova O., Morozkin E., Yarmoschuk S., Vlassov V., Laktionov P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 222–225.
57. Daponte A., Pournaras S., Mademtzis I., Hadjichristodoulou C., Kostopoulou E., Maniatis A., Messinis I. // *J. Clin. Virol.* 2006. V. 36. P. 189–193.
58. Zambrano A., Kalantari M., Simoneau A., Jensen J., Villarreal L. // *Prostate.* 2002. V. 53. P. 263–276.
59. Bhagirath D., Abrol N., Khan R., Sharma M., Seth A., Sharma A. // *Clin. Chim. Acta.* 2012. V. 413. P. 1641–1646.
60. Ouyang B., Bracken B., Burke B., Chung E., Liang J., Ho S. // *J. Urol.* 2009. V. 181. P. 2508–2513.
61. Hanke M., Kausch I., Dahmen G., Jocham D., Warnecke J. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 2070–2077.
62. Miranda K., Bond D., McKee M., Skog J., Paunescu T., Silva N., Brown D., Russo L. // *Kidney Int.* 2010. V. 78. P. 191–199.
63. Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A., Kausch I., Jocham D., Warnecke J., Sczakiel G. // *Urol. Oncology.* 2009. V. 28. P. 665–661.
64. Eissa S., Matboli M., Hegazy M., Kotb Y., Essawy N. // *Transl Res.* 2015. pii. S1931-5244(15)00003-1.
65. Korzeniewski N., Tosev G., Pahernik S., Hadaschik B., Hohenfellner M., Duensing S. // *Urol. Oncol.* 2015. V. 33. P. 16.e17–22.
66. Wang G., Chan E., Kwan B., Li P., Yip S., Szeto C., Ng C. // *Clin. Genitourin. Cancer.* 2012. V. 10. P. 106–113.
67. Dittmar M., Bischofs C., Matheis N., Poppe R., Kahaly G. // *J. Autoimmun.* 2009. V. 32. P. 7–13.
68. Eulitz D., Mannherz H. // *Apoptosis.* 2007. V. 12. P. 1511–1521.
69. Kishi K., Yasuda T., Ikehara Y., Sawazaki K., Sato W., Iida R. // *Am. J. Hum. Genet.* 1990. V. 47. P. 121–126.
70. Ito K., Minamiura N., Yamamoto T. // *J. Biochem.* 1984. V. 95. P. 1399–1406.
71. Nadano D., Yasuda T., Kishi K. // *Clin. Chem.* 1993. V. 39. P. 448–452.
72. Yasuda T., Awazu S., Sato W., Iida R., Tanaka Y., Kishi K. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. P. 393–398.
73. Macanovic M., Lachmann P. // *Clin. Exp. Immunol.* 1997. V. 108. P. 220–226.
74. Mannherz H. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 11661–11664.
75. Hitchcock S. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5668–5673.
76. Calles-Escandon J., Cunningham J., Snyder P., Jacob R., Huszar G., Loke J., Felig P. // *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246. P. e334–338.
77. Murai K., Yamanaka M., Akagi K., Anai M. // *J. Biochem.* 1980. V. 87. P. 1097–1103.
78. Yasuda T., Takeshita H., Nakazato E., Nakajima T., Hosomi O., Nakashima Y., Kishi K. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 255. P. 274–276.
79. Ito K., Yamamoto T., Minamiura N. // *J. Biochem.* 1987. V. 102. P. 359–367.
80. Mizuta K., Yasuda T., Ikehara Y., Sato W., Kishi K. // *Z. Rechtsmed.* 1990. V. 103. P. 315–322.
81. Yasuda T., Sato W., Kishi K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. V. 965. P. 185–194.
82. Potenza N., Salvatore V., Migliozi A., Martone V., Nobile V., Russo A. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2906–2913.
83. Cranston J., Perini F., Crisp E., Hixson C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 616. P. 239–258.
84. Rabin E., Weinberger V. // *Biochem. Med.* 1975. V. 14. P. 1–11.
85. Reddi K. // *Prep. Biochem.* 1977. V. 7. P. 283–299.
86. Spencer J., Schwaderer A., Dirosario J., McHugh K., McGilivray G., Justice S., Carpenter A., Baker P., Harder J., Hains D. // *Kidney Int.* 2011. V. 80. P. 174–180.
87. Iwama M., Kunihiro M., Ohgi K., Irie M. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. P. 1005–1016.
88. Sakakibara R., Hashida K., Kitahara T., Ishiguro M. // *J. Biochem.* 1992. V. 111. P. 325–330.

УДК 577.1

Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*

А. А. Алексеева^{1,2}, И. С. Каргов^{2,3}, С. Ю. Клейменов^{1,4}, С. С. Савин^{1,2,3}, В. И. Тишков^{1,2,3*}¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, оф. 96³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.07.2015

РЕФЕРАТ Ранее нами было показано, что аминокислотные замены в рекомбинантной формиатдегидрогеназе сои *Glycine max* (SoyFDH) Ala267Met и Ala267Met/Phe272Val (Алексеева и соавт., Биохимия, 2012), Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser (Alekseeva et al., Prot. Eng. Des. Select, 2012) приводят к значительному (до 30–100 раз) увеличению термостабильности фермента. Методом направленного мутагенеза в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Phe272Val были введены замены Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser. Объединение трех замен не привело к заметному изменению каталитических свойств мутантного фермента. Стабильность полученных тройных мутантов изучали по кинетике термоинактивации и с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что термостабильность новых мутантных SoyFDH намного выше, чем у их предшественников. По стабильности лучшая форма SoyFDH – Ala267Met/Phe272Val/Phe290Asp – оказалась сравнимой с наиболее стабильными формиатдегидрогеназами дикого типа из других источников. Результаты, полученные обоими методами, свидетельствуют о большом синергическом вкладе отдельных аминокислотных замен в стабилизацию фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белковая инженерия, многоточечные мутанты, рациональный дизайн, стабилизация, стабильность, синергический эффект, формиатдегидрогеназа, *Glycine max*.

ВВЕДЕНИЕ

NAD(P)⁺-зависимые формиатдегидрогеназы ([1.2.1.2], FDH) найдены в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах и растениях [1–3], однако FDH из растений гораздо менее изучены, чем ферменты из микроорганизмов. В нашей лаборатории активно изучаются растительные рекомбинантные формиатдегидрогеназы, в том числе и ФДГ из сои *Glycine max* (SoyFDH) [3–7]. Создана генетическая конструкция, которая позволила экспрессировать SoyFDH в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме [8]. Повышенный интерес к этому ферменту обусловлен тем, что значения констант Михаэлиса

у SoyFDH как по NAD⁺, так и по формиату ниже, чем у формиатдегидрогеназ из других источников (табл. 1). Систематические исследования различных формиатдегидрогеназ [2] и анализ взаимосвязи структура–функция позволили выявить ряд аминокислотных остатков, влияющих на стабильность и каталитические свойства формиатдегидрогеназы сои [3–7]. Методом направленного мутагенеза получено более 20 мутантных форм SoyFDH, больше половины из которых обладали более высокой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа при сохранении низких значений констант Михаэлиса. Наиболее интересные результаты полу-

чены при использовании таких подходов по стабилизации ферментов, как заполнение полости внутри белковой глобулы [4] и замена гидрофобного остатка на гидрофильные на поверхности белковой глобулы [5, 6]. С помощью первого подхода получены SoyFDH с заменой одного и двух аминокислотных остатков – Ala267Met и Ala267Met/Phe272Val соответственно. Причем двойной мутант по термостабильности заметно превосходил своего предшественника [4]. В случае второго подхода гидрофобный остаток Phe290, расположенный на поверхности кофермент-связывающего домена белковой глобулы, был заменен на восемь других аминокислот [5, 6]. В представленной работе в результате введения в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Phe272Val точечных замен Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser получены три тройных мутанта. Предполагалось, что замена Phe290Asp, обеспечивающая наиболее сильный эффект стабилизации, позволит получить тройной мутант с наиболее высокой стабильностью. Два остальных тройных мутанта получены, чтобы выяснить, как различия в эффекте стабилизации в положении 290 будут влиять на общую стабильность и каталитические свойства SoyFDH с тремя аминокислотными заменами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки Molecular Biology Grade. В микробиологических экспериментах применяли бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США), глицерин (99.9%) и хлорид кальция (ultra pure), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия (pure for analysis), лизоцим (Fluka/BioChemika, Швейцария), лактозу (analytical grade), ампициллин и хлорамфеникол (Sigma, США), глюкозу и хлорид натрия («ч.д.а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и ДНК-полимеразу Pfu фирмы Fermentas (Литва) использовали для клонирования фрагментов ДНК и направленного мутагенеза. ДНК из агарозного геля и плазмиды из клеток *E. coli* выделяли с использованием наборов реагентов фирмы Fermentas (Литва). Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции и секвенирования синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). В этих экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

Все реактивы, использованные при электрофорезе белков, произведены фирмой Bio-Rad (США). Для выделения фермента и изучения его свойств применяли NAD^+ с чистотой не менее 98% (AppliChem, Германия), формиат натрия и EDTA (Merck, Германия), азид натрия (Sigma, Германия), сульфат аммония марки «х.ч.» («Диам», Россия), ди-

гидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия и мочевины марки «ч.д.а.» (РеаХим, Россия).

Проведение реакции направленного мутагенеза

Нуклеотидные замены, обеспечивающие замены Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser в аминокислотной последовательности SoyFDH, вводили, как описано ранее [5], однако в качестве исходной матрицы использовали не плазмиду pSoyFDH2 с геном SoyFDH дикого типа, а плазмиду pSoyFDH2_M1M2. Эта плазида содержит ген, кодирующий SoyFDH с заменами Ala267Met и Phe272Val.

Плазмиды, кодирующие каждый из мутантов, выделяли из трех клонов. Правильность введения мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных форм SoyFDH в клетках

E. coli

SoyFDH дикого типа и ее мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (150 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала отбирали единичную колонию с чашки и культивировали ее в течение ночи при 30°C в 4 мл модифицированной среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, дигидрофосфат натрия 1.5 г/л, гидрофосфат калия 1 г/л, pH 7.5) в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Далее клетки пересеивали на свежую среду (разбавление 1 : 100) и культивировали при 37°C до величины $A_{600} \approx 0.6-0.8$. Посевной материал (10% от общего объема среды) вносили в конические колбы объемом 1 л с отбойниками. Далее клетки культивировали при 30°C и 80–90 об/мин до величины поглощения $A_{600} = 0.6-0.8$. Затем клетки индуцировали, добавляя раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч и затем осаждали на центрифуге Eppendorf 5403 (20 мин, 5000 об/мин, +4°C). Полученный осадок ресуспендировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 в соотношении 1 : 4 (масс.). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20°C.

Выделение и очистка мутантных ферментов

Для выделения мутантных SoyFDH 20% суспензию клеток в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 подвергали двум циклам замораживания-оттаива-

ния, затем клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804R (11000 об/мин, 30 мин).

Процедура очистки фермента включала высаживание балластных белков сульфатом аммония (40% от насыщения), осаждение целевого белка (при концентрации сульфата аммония 85% от насыщения) и его последующее перерастворение в растворе, содержащем 45% сульфата аммония, гидрофобную хроматографию на фенолсефарозе и обессоливание на колонке с Сефадексом G-25 [4, 5]. Чистоту препарата контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы Bio-Rad).

Измерение активности формиаатдегидрогеназы

Активность фермента определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV1800PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.3 М формиат натрия и 0.4 мг/мл NAD⁺.

Определение констант Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD⁺ и формиату определяли спектрофотометрически, измеряя зависимость активности фермента от концентрации одного из субстратов в диапазоне от 0.3 до 6–7 K_M при насыщающих концентрациях второго субстрата ($> 20 K_M$). Точную концентрацию исходных растворов NAD⁺ измеряли при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Точную концентрацию формиата натрия определяли энзиматически с помощью формиатдегидрогеназы по образованию NADH в результате окисления формиат-иона до CO₂. В кварцевую кювету спектрофотометра (общий и рабочий объемы 4 и 2 мл соответственно) добавляли 50 мкл раствора NAD⁺ (20 мг/мл в 0.1 М фосфатном буфере, pH 8.0), 20 мкл раствора формиатдегидрогеназы (50 ед./мл) и 0.1 М фосфатный буфер, pH 8.0 до общего объема 1.96 мл. Кювету термостатировали 15 мин при 37°C, фиксировали поглощение на 340 нм. Из мерной колбы с раствором формиата натрия в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, приготовленного по навеске из расчета финальной концентрации 3 М, стеклянной пипеткой с рабочим объемом 0.1 мл отбирали 0.1 мл раствора, добавляли в мерную колбу объемом 100 мл с 0.1 М фосфатным буфером, pH 8.0 и доводили объем по метке до 100 мл тем же буфером. Полученный раствор перемешивали, отбирали пробу объемом 40 мкл раствора и вносили в кювету с реакционной смесью. По завершении

реакции (15–20 мин) измеряли поглощение раствора, из которого вычитали величину начального поглощения, и из значения разницы рассчитывали точную концентрацию формиата натрия. Значения K_M определяли методом нелинейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Определение величины каталитических констант

Величины каталитических констант нескольких препаратов фермента с различной активностью рассчитывали, определяя концентрации активных центров по тушению флуоресценции фермента NAD⁺ и азид-ионом [7]. Измерения проводили в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, на флуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Значение каталитической константы определяли как тангенс угла наклона зависимости активности фермента от концентрации активных центров методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Изучение термостабильности по кинетике термоинактивации

Термостабильность фермента анализировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.01 М EDTA. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1.5 мл по 50 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (46–60°C, точность термостатирования $\pm 0.1^\circ\text{C}$). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную активность формиатдегидрогеназы измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации k_{in} определяли как тангенс угла наклона зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Изучение термостабильности ферментов методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Эксперименты по дифференциальной сканирующей калориметрии проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО «Биоприбор», Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия). Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из платины составлял 0.48 мл. С целью предотвращения образования пузырьков

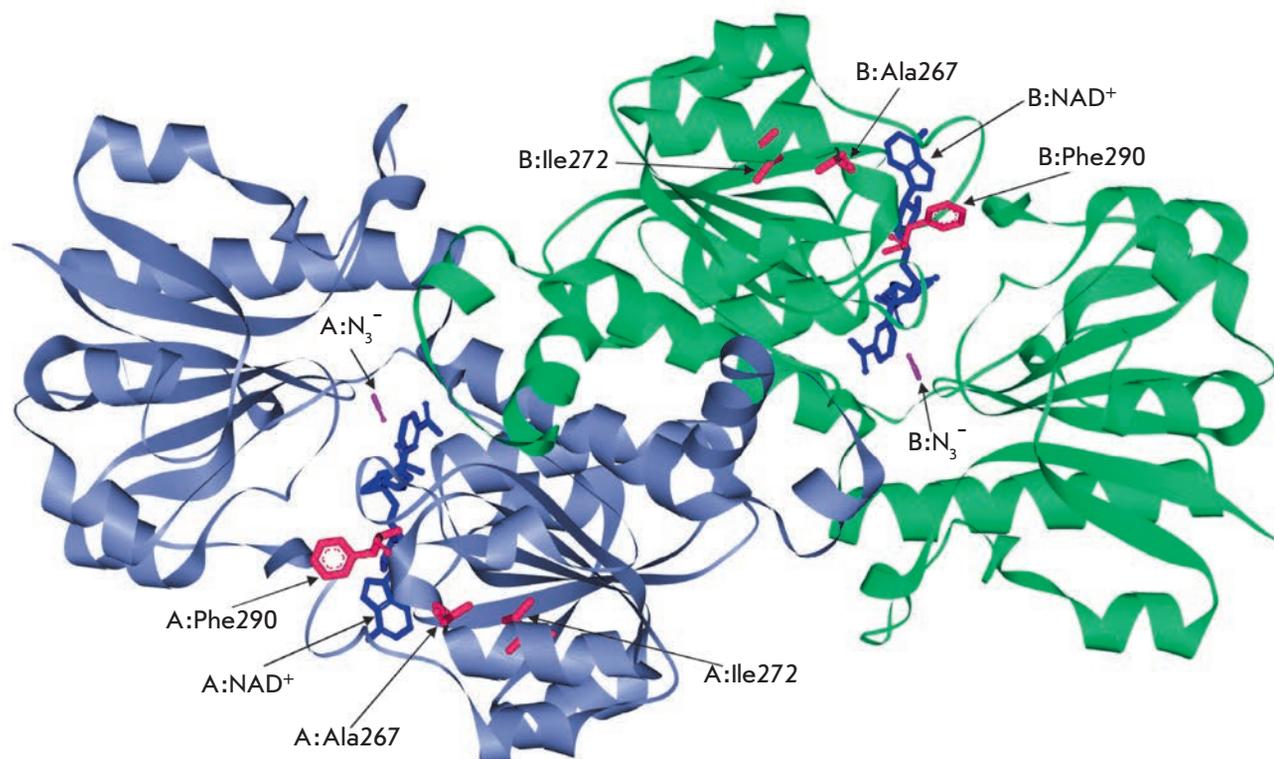


Рис. 1. Трехмерная структура тройного комплекса [SoyFDH-NAD⁺-N₃⁻].

воздуха и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживали избыточное давление 2.2 атм. Калибровку приборов ДАСМ-4 осуществляли, подавая на одну ячейку фиксированную мощность ($\Delta W = 25$ мкВт).

Перед проведением калориметрического эксперимента определяли собственный дрейф показаний прибора от температуры. При измерениях в контрольную ячейку помещали 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0, а в рабочую – раствор SoyFDH в том же буфере. Концентрация ферментов – 2.0 мг/мл, а скорость прогрева – 1°C/мин.

Обратимость тепловой денатурации проверяли с помощью повторного сканирования образца после его охлаждения до 10–12°C непосредственно в калориметре. Отсутствие пика денатурации при повторном измерении подтверждало ее необратимый характер.

Обработку и анализ кривых денатурации проводили по стандартной методике с помощью специальных макросов, используя программу Matlab 8.0. Перед определением характеристик денатурации из полученных данных вычитали собственный дрейф калориметра и ступенчатое изменение теплоемкости, связанное с полной денатурации. Калориметрическую энтальпию денатурации ($\Delta H_{\text{кал}}$) рассчитывали из площади

под кривой зависимости избыточной теплоемкости белка от температуры; температуру денатурации (плавления) T_m – как температуру максимума на той же кривой. Погрешность при расчете $\Delta H_{\text{кал}}$ составляла 5–8%. Экспериментальная ошибка измерения T_m не превышала 0.2°C.

Компьютерное моделирование

Структуру SoyFDH анализировали с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1. Этот же пакет использовали для получения изображений белковой глобулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось, тройные мутанты SoyFDH были получены в результате введения трех аминокислотных остатков – Asp, Asn и Ser в 290-е положение двойного мутанта с заменами Ala267Met/Ile272Val. На рис. 1 показана структура тройного комплекса [SoyFDH-NAD⁺-N₃⁻] с указанием положения в белковой глобуле остатков Ala267, Ile272 и Phe290, выбранных для направленного мутагенеза. Из этого рисунка видно, что все три остатка расположены в коферментсвязывающем домене, однако первые два остатка намного дальше удалены от молекулы NAD⁺, чем остаток Phe290. Замены в 290-м положении гораздо заметнее из-

Таблица 1. Кинетические параметры мутантных форм формиатдегидрогеназы из сои в сравнении с ферментами из других источников

| Фермент | k_{cat} , с ⁻¹ | $K_M^{formate}$, мМ | $K_M^{NAD^+}$, мкМ | $k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, (мкМ с) ⁻¹ | $k_{cat}/K_M^{formate}$, (мМ с) ⁻¹ | Ссылка |
|--|--------------------------------|-------------------------|------------------------|--|---|-----------------------|
| wt-SoyFDH | 2.9 | 1.5 | 13.3 | 0.22 | 1.93 | [4–6] |
| SoyFDH M1 (A267M) | 5.0 | 2.1 | 9.9 | 0.51 | 2.38 | [4] |
| SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V) | 2.2 | 2.4 | 13.3 | 0.17 | 0.92 | [4] |
| SoyFDH M3 (F290N) | 2.8 | 4.5 | 14.0 | 0.40 | 1.02 | [5] |
| SoyFDH M4 (F290D) | 5.1 | 5.0 | 12.8 | 0.20 | 0.62 | [5] |
| SoyFDH M5 (F290S) | 4.1 | 4.1 | 9.1 | 0.45 | 1.00 | [5] |
| SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N) | 3.2 ± 0.2 | 2.2 ± 0.3 | 14.1 ± 0.7 | 0.23 | 1.45 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D) | 2.9 ± 0.2 | 2.8 ± 0.4 | 20.3 ± 1.3 | 0.14 | 1.04 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S) | 3.7 ± 0.1 | 2.3 ± 0.3 | 16.1 ± 0.4 | 0.23 | 1.61 | Данная работа |
| wt-AthFDH | 3.8 | 2.8 | 50 | 0.08 | 1.36 | [8] |
| wt-LjaFDH | 1.2 | 6.1 | 25.9 | 0.05 | 0.20 | [9] |
| wt-CboFDH | 3.7 | 5.9 | 45 | 0.08 | 0.63 | [10, 11] |
| wt-MorFDH | 7.3 | 7.5 | 80 | 0.09 | 0.97 | [2] |
| wt-PseFDH | 7.3 | 6.5 | 65 | 0.11 | 1.12 | [2] |
| PseFDH GAV | 7.3 | 6 | 35 | 0.21 | 1.22 | [2, 3] |
| PseFDH SM4 | 7.3 | 3.2 | 41 | 0.18 | 2.28 | Собственные данные |

меняли как каталитические свойства, так и температурную стабильность, чем замены в положениях 267 и 272 [4–6]. Предположили, что объединение трех аминокислотных замен позволит получить еще более стабильную мутантную SoyFDH. В дальнейшем для удобства замены Ala267Met, Ile272Val, Phe290Asn, Phe290Asp и Phe290Ser обозначили как M1, M2, M3, M4 и M5 соответственно.

Получение мутантных форм SoyFDH

Замены нуклеотидов, обеспечивающие возникновение требуемых мутаций, осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции. Выделяли по три плазмиды для каждого из трех мутантов. По данным секвенирования во всех плаزمиде ген *soyfdh* содержал только требуемые мутации. Плазмидами, кодирующими ген *soyfdh* с мутациями, приводящими к заменам аминокислот (A267M/I272V/F290N), (A267M/I272V/F290D) и (A267M/I272V/F290S), трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Показано, что все три мутантные SoyFDH экспрессировались в рекомбинантных штаммах в активной и растворимой форме. Согласно данным аналитического электрофореза в полиакри-

ламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия чистота выделенных препаратов SoyFDH составила не менее 95%.

Кинетические свойства ферментов

В табл. 1 представлены значения каталитической константы и констант Михаэлиса по NAD⁺ и формиату трех новых многоточечных мутантных SoyFDH, а также аналогичные значения для мутантов-предшественников и некоторых других формиатдегидрогеназ бактерий, дрожжей и растений. Из табл. 1 видно, что введение дополнительной замены в 290-е положение двойного мутанта практически не влияет на константу Михаэлиса по формиату, в то время как значение K_M по NAD⁺ или сравнимо, или выше, чем у двойного мутанта-предшественника. Эти данные хорошо коррелируют с тем фактом, что все мутируемые остатки расположены в коферментсвязывающем домене. Каталитическая константа у двойного мутанта меньше, чем у точечных мутантов с заменой в 290-м положении. Объединение трех замен приводит к тому, что величина k_{cat} у тройных мутантов или сравнима, или выше, чем у двойного, но меньше, чем при точечных заменах

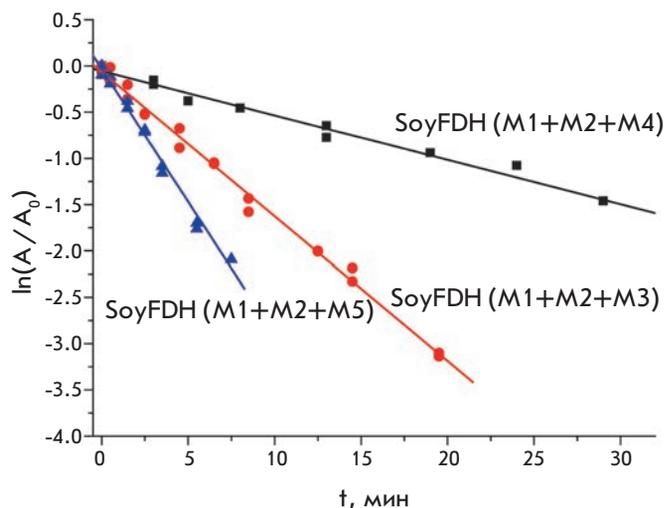


Рис. 2. Зависимость натурального логарифма остаточной активности многоточечных мутантных SoyFDH от времени при 64°C, 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

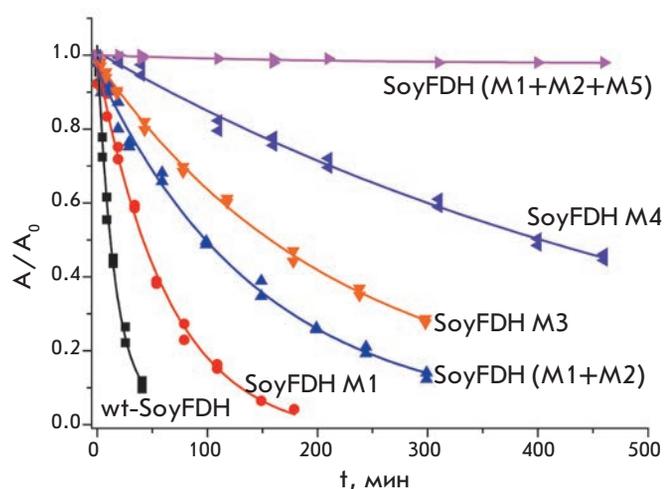


Рис. 3. Зависимость остаточной активности SoyFDH дикого типа (wt-SoyFDH) и некоторых мутантных форм от времени при 54°C, 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

Phe290Asp и Phe290Asn. Также следует отметить отсутствие корреляции между каталитическими свойствами двойного, тройных и точечных мутантов. Например, мутант SoyFDH Phe290Asp имеет самое высокое значение k_{cat} среди точечных мутантов с заменой в 290-м положении, а тройной мутант, также содержащий эту замену, имеет самую низкую среди многоточечных мутантов каталитическую константу.

Обобщая сказанное, можно сделать вывод, что у SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn и Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser кинетические параметры и каталитические свойства остались на уровне фермента дикого типа и мутантных форматдегидрогеназ из *Pseudomonas* sp. 101 – PseFDH GAV и PseFDH SM4 (табл. 1), а у мутанта SoyFDH – A267M/I272V/F290D – эти параметры немного ухудшились, но остались все же лучше, чем у CboFDH, широко используемой в настоящее время.

Изучение температурной стабильности мутантных SoyFDH по кинетике термоинактивации

Кинетику термоинактивации мутантных SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn и Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser изучали в диапазоне температур 58–64°C, а SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp – в интервале 60–66°C. Выбор интервала температур определялся более высокой стабильностью последнего мутанта, поэтому для достижения временных интервалов, за которые происходит такое же, как и у других мутантов, падение активности, приходилось использовать бо-

лее высокие температуры. Во всем диапазоне температур кинетика инактивации соответствовала кинетике реакции первого порядка. Из величины тангенсов углов наклона этих прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Величина константы скорости инактивации не зависела от концентрации фермента во всем исследованном диапазоне температур, что свидетельствовало об истинно мономолекулярном механизме процесса термоинактивации. На рис. 2 приведена зависимость натурального логарифма остаточной активности трех новых мутантных ферментов от времени при температуре 64°C. Видно, что мутантная SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp обладает более высокой стабильностью, чем два других тройных мутанта. К сожалению, кривые инактивации мутантов-предшественников невозможно получить при этой температуре, так как в этих условиях они почти полностью инактивировались менее чем за 5 мин. Для наглядности эффекта стабилизации на рис. 3 представлены зависимости остаточной активности нескольких мутантных SoyFDH от времени при 54°C. Видно, что SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp практически не инактивируется в течение почти 8 ч, в то время как период полуинактивации фермента дикого типа и мутантных SoyFDH с заменами Ala267Met, Ala267Met/Ile272Val и Phe290Asp составляет 19, 56, 153 и 460 мин соответственно. Таким образом, можно говорить о большом аддитивном эффекте, который замена в 290-м положении, введен-

ная в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Ile272Val, оказывает на увеличение термостабильности фермента.

На рис. 4 представлены температурные зависимости констант скорости термоинактивации мутантных SoyFDH с тройными заменами и фермента дикого типа в координатах $\ln(k_{in}/T)$ от $1/T$, где T – температура в градусах Кельвина. Данные координаты позволяют получить линейную анаморфозу уравнения зависимости константы скорости от температуры для теории активированного комплекса [12]:

$$\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

где k_B и h – константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, а ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger активационные параметры.

Линейная форма полученных зависимостей говорит о том, что зависимость константы скорости термоинактивации нативной SoyFDH и мутантных форм действительно описывается уравнением теории активированного комплекса.

В табл. 2 приведены численные значения активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса термоинактивации, рассчитанных из зависимостей констант скорости термоинактивации от температуры с использованием

уравнения из теории активированного комплекса. Видно, что величины энтальпии ΔH^\ddagger и энтропии ΔS^\ddagger активации фермента с тройной заменой Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp – самые высокие среди всех исследованных мутантных форм SoyFDH

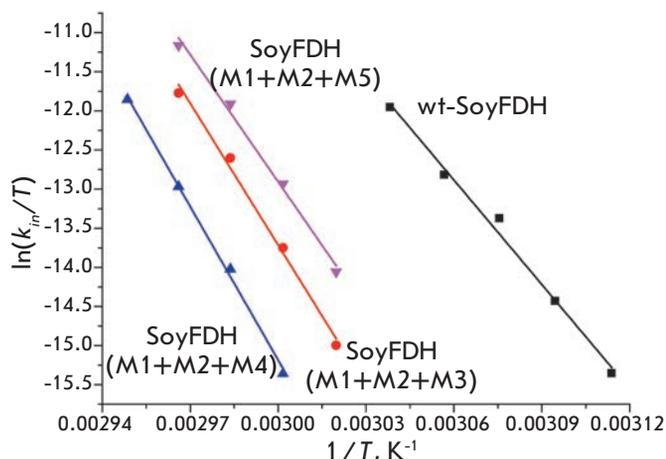


Рис. 4. Зависимость констант скорости термоинактивации мутантных SoyFDH и фермента дикого типа от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T, K^{-1}$. 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

Таблица 2. Активационные параметры процесса термоинактивации различных мутантных SoyFDH, фермента дикого типа и формиатдегидрогеназ дикого типа из различных источников (0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0)

| Фермент | ΔH^\ddagger , кДж/моль | ΔS^\ddagger , Дж/(моль К) | Ссылка |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| wt-SoyFDH | 370 ± 20 | 830 ± 60 | [4] |
| SoyFDH M1 (A267M) | 400 | 900 | [4] |
| SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V) | 450 ± 30 | 1040 ± 80 | [4] |
| SoyFDH M3 (F290N) | 450 ± 20 | 1050 ± 60 | [5] |
| SoyFDH M4 (F290D) | 520 ± 30 | 1240 ± 70 | [5] |
| SoyFDH M5 (F290S) | 440 ± 20 | 1020 ± 70 | [5] |
| SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N) | 500 ± 30 | 1190 ± 90 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D) | 540 ± 20 | 1310 ± 50 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S) | 450 ± 30 | 1050 ± 80 | Данная работа |
| wt-AthFDH* | 490 | 1200 | [2] |
| wt-PseFDH* | 540 | 1320 | [2] |
| wt-CboFDH* | 500 | 1360 | [13] |
| wt-SceFDH* | 420 | н.д.** | [14] |

*AthFDH, PseFDH, CboFDH, SceFDH – формиатдегидрогеназы из растений *Arabidopsis thaliana*, бактерий *Pseudomonas* sp. 101, дрожжей *Candida boidinii* и *Saccharomyces cerevisiae* соответственно.

** н.д. – нет данных.

и практически такие же, как и у одной из самых термостабильных FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH). Следует отметить, что значения ΔH^* и ΔS^* у мутанта с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp выше, чем у форматдегидрогеназы из дрожжей *Candida boidinii* и растения *Arabidopsis thaliana*.

Из табл. 2 видно, что у SoyFDH дикого типа значение энтальпии активации ниже, чем у ее мутантов. Это означает, что при снижении температуры величина константы скорости термоинактивации у всех мутантных SoyFDH будет уменьшаться быстрее, чем у SoyFDH дикого типа, т.е. при уменьшении температуры эффект стабилизации должен увеличиваться. Используя уравнение теории активированного комплекса и значения ΔH^* и ΔS^* , полученные для SoyFDH дикого типа и мутантных ферментов, были рассчитаны величины констант скорости тер-

моинактивации и эффекта стабилизации в широком диапазоне температур. В табл. 3 представлены значения эффекта стабилизации мутантных SoyFDH по отношению к ферменту дикого типа. Видно, что у наиболее стабильного мутантного фермента с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp эффект стабилизации при повышенных температурах (46–66°C) составляет от 2330 до 51 раза. Это гораздо больше, чем у наиболее удачного точечного мутанта Phe290Asp. Таким образом, мутант Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp является самым термостабильным из мутантных SoyFDH, рассмотренных в данной работе, он превосходит по термостабильности форматдегидрогеназу *A. thaliana* и *C. boidinii*.

Поскольку все мутируемые остатки расположены в коферментсвязывающем домене, было интересно оценить вклад замены в 290-м положении в общий эффект стабилизации тройного мутанта. Для оценки

Таблица 3. Значения эффекта стабилизации* мутантных SoyFDH по отношению к ферменту дикого типа при различных температурах (0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0)

| T, °C | Эффект стабилизации | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7** | 8 | 9** | 10 | 11** | 12 |
| | wt-SoyFDH | SoyFDH M1 (A267M) [4] | SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V) [4] | SoyFDH M3 (F290N) [5] | SoyFDH M4 (F290D) [5] | SoyFDH M5 (F290S) [5] | Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M3 | SoyFDH M1+M2+M3 | Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M4 | SoyFDH M1+M2+M4 | Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M5 | SoyFDH M1+M2+M5 |
| 25 | 1 | 9 | 130 | 200 | 11000 | 52 | 26000 | 9200 | 1430000 | 233200 | 6760 | 450 |
| 30 | 1 | 7 | 81 | 120 | 4100 | 33 | 9720 | 3820 | 332100 | 73540 | 2673 | 265 |
| 46 | 1 | 4.3 | 18 | 25 | 230 | 8.8 | 450 | 280 | 4140 | 2330 | 158 | 54 |
| 48 | 1 | 4 | 15 | 20 | 160 | 7.5 | 300 | 188 | 2400 | 1440 | 114 | 41 |
| 50 | 1 | 3.8 | 13 | 17 | 120 | 6.5 | 221 | 148 | 1560 | 1030 | 85 | 37 |
| 52 | 1 | 3.6 | 11 | 15 | 85 | 5.5 | 165 | 135 | 935 | 856 | 61 | 38 |
| 54 | 1 | 3.4 | 8.9 | 12 | 61 | 4.8 | 107 | 76 | 5439 | 436 | 43 | 24 |
| 56 | 1 | 3.2 | 7.5 | 10 | 44 | 4.1 | 75 | 58 | 330 | 308 | 30.8 | 21 |
| 58 | 1 | 3 | 6.4 | 8.6 | 32 | 3.5 | 55 | 50 | 205 | 218 | 22 | 19 |
| 60 | 1 | 2.8 | 5.4 | 7.3 | 23 | 3.1 | 39 | 32 | 124 | 160 | 17 | 14 |
| 62 | 1 | 2.7 | 4.6 | 6.1 | 17 | 2.7 | 28 | 23 | 78 | 93 | 12 | 11 |
| 64 | 1 | 2.5 | 3.9 | 5.2 | 12 | 2.3 | 20 | 22 | 47 | 71 | 9 | 12 |
| 66 | 1 | | | | | | | 15 | | 51 | | 9 |

Эффект стабилизации рассчитывали как отношение соответствующих констант скорости инактивации при одной температуре. Полужирным шрифтом выделены величины, полученные с использованием экспериментальных данных. Остальные значения рассчитаны с помощью уравнения теории активированного комплекса с использованием полученных параметров ΔH^ и ΔS^* .

**В колонках 7, 9 и 11 указан теоретически возможный эффект стабилизации, полученный при умножении эффекта стабилизации исходного двойного мутанта на эффект стабилизации за счет замены в 290-м положении.

такого вклада используется понятие аддитивности. С этой целью сравнивают экспериментальное значение эффекта стабилизации с теоретически возможным. Если эффекты стабилизации в исходных мутантах не зависят друг от друга, то теоретический эффект стабилизации мутанта, в котором объединены рассматриваемые замены, будет равен произведению эффектов стабилизации исходных мутантов. Если теоретическое значение совпадает с экспериментальным, то говорят о 100% аддитивности. Если эта величина менее 100%, то аддитивность не полная, а если более 100% – то существует положительная кооперативность или синергичность эффекта стабилизации. В табл. 3 в колонках 7, 9 и 11 представлены значения теоретического суммарного эффекта стабилизации, рассчитанного как произведение величины эффекта стабилизации исходной мутантной SoyFDH с двойной заменой Ala267Met/Ile272Val на величину эффекта стабилизации мутанта с соответствующей заменой в 290-м положении. Из колонок 6 и 7 видно, что в случае мутантной SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn при температуре 64°C наблюдается 100% аддитивность, а при уменьшении температуры этот параметр начинает медленно снижаться. Аналогичная картина наблюдается и у мутантной SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser (табл. 3, колонки 11 и 12) при 62°C и ниже, а при температуре 64°C аддитивность стабилизации превышает 100%. Очень интересная картина наблюдается и у наиболее стабильного мутанта SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp (табл. 3, колонки 9 и 10). При всех использованных температурах аддитивность стабилизации превышает 100%, хотя при уменьшении температуры эта величина снижается, как и в двух предыдущих случаях. Высокую аддитивность эффекта стабилизации при объединении нескольких аминокислотных замен (до 100%) наблюдали и для FDH бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [15, 16], однако сами величины стабилизирующих эффектов (в 1.1–2.5 раза) просто не сравнимы с эффектами, полученными в данной работе.

Причина увеличения теоретического эффекта стабилизации (и, как следствие, снижение эффекта аддитивности) при снижении температуры пока не ясна, однако следует обратить внимание, что константа скорости термоинактивации у разных мутантов SoyFDH по-разному зависит от температуры, и при объединении аминокислотных замен суммарное изменение структуры белка, обусловленное этими мутациями, может отличаться при разных температурах. Более точно понять причины наблюдаемого эффекта помогут дополнительные эксперименты, проведение которых в цели и задачи нашей работы не входило.

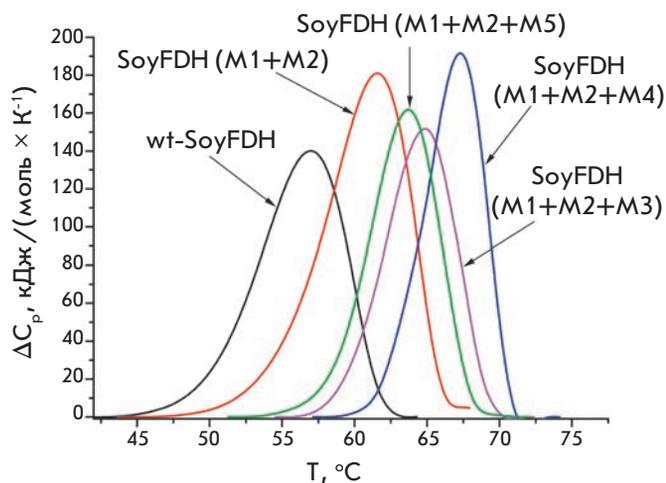


Рис. 5. Кривые плавления многоточечных мутантных SoyFDH и фермента дикого типа. 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. Концентрация ферментов – 2 мг/мл, скорость нагрева 1 град/мин. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

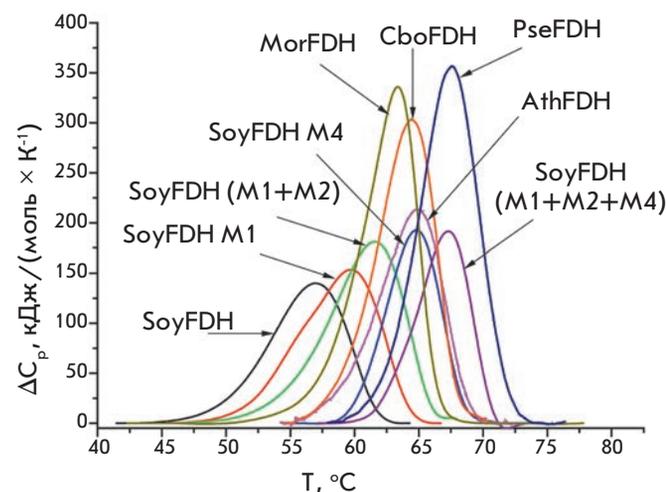


Рис. 6. Кривые плавления, полученные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, для формиаатдегидрогеназ дикого типа из различных источников и многоточечных мутантных SoyFDH. 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. Концентрация ферментов – 2 мг/мл, скорость нагрева 1 град/мин. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser. PseFDH, MorFDH, CboFDH, SoyFDH и AthFDH – рекомбинантные формиаатдегидрогеназы дикого типа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Moraxella* sp. C1, дрожжей *Candida boidinii*, сои *Glycine max* и арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* соответственно.

Таблица 4. Параметры фазовых переходов мутантных форм и SoyFDH дикого типа (0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0)

| Фермент | Температура фазового перехода, T_m , °C | $T_m - T_m^{wt-SoyFDH}$, °C | Показатель кооперативности, $T_{1/2}$, °C | Ссылка |
|-------------------------------------|---|------------------------------|--|---------------|
| wt-PseFDH | 67.6 | 10.6 | 5.4 | [17] |
| PseFDH GAV | 68.9 | 11.9 | 5.3 | [17] |
| wt-AthFDH | 64.9 | 7.9 | 5.9 | [17] |
| wt-CboFDH | 64.4 | 7.4 | 5.3 | [17] |
| wt-SoyFDH | 57.0 | 0.0 | 7.1 | [5] |
| SoyFDH M1 (A267M) | 59.7 | 2.7 | 7.5 | [4] |
| SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V) | 61.6 | 4.6 | 6.8 | [4] |
| SoyFDH F290D | 64.8 | 7.8 | 5.0 | [5] |
| SoyFDH F290N | 61.3 | 4.3 | 6.6 | [5] |
| SoyFDH F290S | 59.9 | 2.9 | 6.4 | [5] |
| SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N) | 64.9 | 7.9 | 5.8 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D) | 67.3 | 10.3 | 4.8 | Данная работа |
| SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S) | 63.7 | 6.7 | 5.6 | Данная работа |

Изучение температурной стабильности мутантных SoyFDH методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Результаты исследования многоточечных мутантных SoyFDH с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии представлены на рис. 5. Для сравнения также приведена кривая плавления двойного мутанта SoyFDH Ala267Met/Ile272Val. Из рис. 5 видно, что увеличение температуры теплового перехода тройных мутантов по сравнению с двойным имеет ту же тенденцию, что и при определении термостабильности по кинетике термоинактивации – чем выше эффект стабилизации за счет замены в 290-м положении, тем выше температура фазового перехода тройного мутанта. Как и следовало ожидать, самым стабильным оказался мутант SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp.

На рис. 6 представлены кривые плавления наиболее стабильных мутантных SoyFDH и ферментов из других источников, которые позволяют оценить величину увеличения термостабильности мутантов. Видно, что SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp стабильнее FDH из *A. thaliana*, *C. boidinii* и *Moraxella* sp. C1 и очень близка к ферменту из *Pseudomonas* sp.

101 (PseFDH), одному из наиболее стабильных среди описанных формиаатдегидрогеназ [2, 15].

В табл. 4 приведены численные значения параметров фазовых переходов. Видно, что из всех многоточечных мутантов FDH сои самую высокую температуру фазового перехода имеет SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp, что хорошо согласуется с данными по кинетике термоинактивации. Сравнение этой мутантной формы с формиаатдегидрогеназами из других источников показало, что этот фермент по термостабильности занимает второе место после PseFDH.

Таким образом, нами получены три мутантные формы формиаатдегидрогеназы из сои, обладающие гораздо более высокой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа, а также двойные и точечные мутанты-предшественники. Отличительной особенностью является то, что этот эффект достигнут без существенного изменения каталитических параметров по сравнению с исходной SoyFDH. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 14-04-01625-а и 14-04-01665-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537–1554.
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. № 1. P. 89–110.
3. Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 4(11). С. 40–56.
4. Алексеева А.А., Савин С.С., Клейменов С.Ю., Упоров И.В., Пометун Е.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1443–1456

5. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I. // Protein Eng. Des. Sel. 2012. V. 25. № 11. P. 781–788.
6. Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // Protein Eng. Des. Sel. 2015. V. 28. № 6. P. 171–178.
7. Романова Е.Г., Алексеева А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. № 3. С. 156–159.
8. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 1. С. 31–34.
9. Andreadeli A., Flemetakis E., Axarli I., Dimou M., Udvardi M. K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 976–984.
10. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 1280–1289.
11. Felber S. Optimierung der NAD⁺-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. Ph.D. Thesis. Heinrich-Heine University of Duesseldorf, 2001. URL: <http://diss.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>.
12. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2012. 510 p.
13. Тишков В.И., Уланова С.В., Федорчук В.В., Савин С.С. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 2(5). С. 86–92
14. Серов А.Е., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 2. С. 79–82.
15. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // FEBS Lett. 1999. V. 445. № 1. P. 183–188.
16. Серов А.Е., Одицева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 7. С. 974–979.
17. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Уланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2006. Т. 42. № 3. С. 269–273.

УДК 577.112

Структурно-функциональная характеристика рекомбинантных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы

И. В. Богданов, Е. И. Финкина, С. В. Баландин, Д. Н. Мельникова, Е. А. Стукачева,
Т. В. Овчинникова*

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

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 06.02.2015

РЕФЕРАТ Рекомбинантные изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3 липид-транспортирующего белка чечевицы получены путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Подтверждено, что структура данных белков стабилизирована четырьмя дисульфидными связями и содержит α -спиральные участки. Установлено, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3 обладают антимикробной активностью и способностью связывать жирные кислоты. Обе изоформы связываются со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3. Показано, что иммунологические свойства обеих изоформ имеют черты сходства с другими растительными аллергенными LTP, но Lc-LTP3 обладает менее выраженной иммунореактивностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллерген, антимикробная активность, гетерологичная экспрессия, изоформа, липид-транспортирующий белок, перекрестная реактивность, связывание липидов, чечевица.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия; ТНС – 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота; BSA – бычий сывороточный альбумин; ТФУ – трифторуксусная кислота; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ; GSH и GSSG – восстановленный и окисленный глутатион соответственно; LTP (lipid transfer proteins) – липид-транспортирующие белки; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7.4); TBS – трис-солевой буферный раствор (20 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.4); TBST – трис-солевой буферный раствор, содержащий 0.05% Твин-20; TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

ВВЕДЕНИЕ

Липид-транспортирующие белки (LTP) растений составляют класс небольших катионных белков, пространственная структура которых содержит три или четыре α -спирали и стабилизирована четырьмя дисульфидными связями. Благодаря наличию в структуре гидрофобной впадины растительные LTP обладают способностью обратимо связывать и переносить разнообразные молекулы липидов [1]. Многие представители этого класса белков обладают антимикробной активностью и ингибируют рост и размножение фитопатогенных бактерий и грибов. Синтез LTP у растений индуцируется при воздействии различных стрессовых факторов, включая атаку фитопатогенных микроорганизмов, недостаток влаги, засоление почвы и др. [2]. Как полагают, растительные LTP принимают участие в защите растений

от воздействия абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды, в биосинтезе клеточной стенки, депонировании кутикулярного воска, модуляции роста растений и во многих других процессах [3].

Структура растительных LTP характеризуется высокой устойчивостью к термической денатурации и химической деградации, а также к ферментативному расщеплению. Считается, что многие LTP, обладающие повышенной устойчивостью к деградации ферментами пищеварительного тракта, являются сильными аллергенами, участвующими в развитии аллергических реакций на растительные пищевые продукты [4]. Многие LTP вызывают аллергию на латекс и пыльцу. Доминирующим аллергеном класса LTP, обладающим высокой алергизирующей способностью и участвующим в развитии перекрестных

аллергических реакций на растительные пищевые продукты и пыльцу, является основным аллерген персика Pru p 3 [5].

В настоящее время природные и рекомбинантные аллергены, в том числе принадлежащие к классу LTP, широко используются при создании современных тест-систем для проведения компонентной аллергодиагностики. Также ведутся исследования, направленные на создание на основе природных и рекомбинантных аллергенов вакцин, предназначенных для проведения превентивной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) [6]. Различные изоформы аллергенов, как правило, характеризуются разной иммунореактивностью. Поэтому актуальным представляется поиск и изучение изоформ со сниженной иммунореактивностью, способных служить основой для создания гипоаллергенных вариантов основных аллергенов, обладающих высокой клинической эффективностью и низким риском развития побочных реакций при проведении АСИТ [7].

Ранее в семенах чечевицы *Lens culinaris* нами было обнаружено подсемейство из восьми липид-транспортирующих белков (Lc-LTP1–8). Один из этих белков, а именно Lc-LTP2, был выделен и охарактеризован как белок, обладающий антимикробной активностью [8]. Было установлено, что Lc-LTP2, как и ряд других растительных LTP, является пищевым аллергеном, зарегистрированным нами в базе данных аллергенов IUIS под аббревиатурой Len c 3 [9]. Наша работа посвящена разработке способа получения и сравнительному исследованию структурно-функциональных и иммунологических свойств двух изоформ LTP чечевицы – Lc-LTP1 и Lc-LTP3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гетерологичная экспрессия LTP в клетках

Escherichia coli

Для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые белки, проводили ПЦР с кДНК чечевицы *L. culinaris* или персика *Prunus persica* и следующими парами ген-специфичных праймеров:

Lc-LTP1

5'-GCGAGATCTATTGATGGAAGAATGGCAATCTCATGCGGAACA-3' (прямой)

5'-GCGAATTTCGCGGATCCTTAGAACCTGATGGTG-3' (обратный);

Lc-LTP3

5'-GCGAGATCTGATCCGATGGCAGTCTCATGTGGAAC-3' (прямой)

5'-GCGAATTTCGCGGATCCTTCAAACTTATG-3' (обратный);

Pru p 3

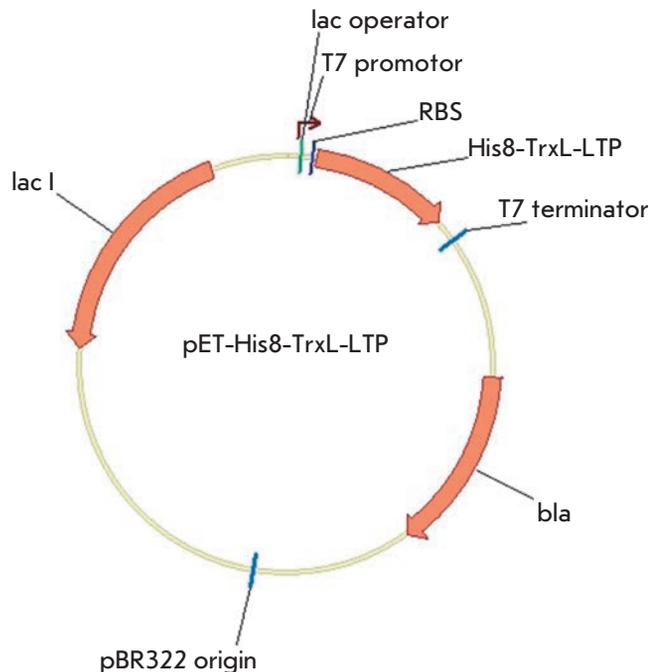


Рис. 1. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pET-His8-TrxL-LTP. Плазмидный вектор включает промотор бактериофага T7, lac-оператор, сайт связывания рибосомы (RBS), последовательность, кодирующую гибридный белок (His8-TrxL-LTP, где LTP – Lc-LTP1, Lc-LTP3 или Pru p 3), терминатор транскрипции T7, bla – ген устойчивости к β-лактамам антибиотикам, lacI – ген репрессора lac

5'-GCGGGATCCATGATAACATGTGGCCAAG-3' (прямой)

5'-GCGGAATTCTCACTTCACGGTGGCGCAGTT-3' (обратный).

Экспрессионные кассеты, включающие T7-промотор, сайт связывания рибосомы, стартовый кодон (ATG), последовательности, кодирующие гистиновый октамер и модифицированный тиоредоксин А (M37L), сайты расщепления (Ile-Asp-Gly-Arg-Met, Asp-Pro-Met или Met) и зрелые белки Lc-LTP1 (GenBank AY793553), Lc-LTP3 (GenBank AY793555) и Pru p 3 (GenBank AY792996), были собраны в результате нескольких последовательных этапов ПЦР и лигированы с BglIII/XhoI-фрагментом низкокопийного плазмидного вектора pET-31b(-) (Novagen) размером 5.25 т.п.н. В результате были получены экспрессирующие плазмиды pET-His8-TrxL-Lc-LTP1, pET-His8-TrxL-Lc-LTP3 и pET-His8-TrxL-Pru-p-3 длиной 6047, 6043 и 6021 п.н. соответственно (рис. 1). Этими плазмидными векторами были трансформированы клетки *E. coli* штамма BL-21(DE3), несущего ген T7-РНК-полимеразы.

Клетки штаммов-продуцентов культивировали в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы, до $A_{600} \sim 0.7$. Синтез LTP индуцировали, добавляя в среду изопропилтио- β -D-галактопиранозид до конечной концентрации 0.2 мМ, после чего клетки выращивали в заполненных на четверть питательной средой колбах емкостью 2 л в течение 4–5 ч при температуре 25°C (в случае Lc-LTP3 и Pru p 3) или 37°C (в случае Lc-LTP1), используя термостатируемый орбитальный инкубатор и частоту перемешивания 220 об/мин.

Выделение и очистка рекомбинантных LTP

Клеточные осадки, полученные в результате центрифугирования, ресуспендировали в буферном растворе А (50 мМ трис-НСl, 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол, рН 7.8), содержащем 1 мМ фенолметилсульфонилфторид, в соотношении 1 : 5 (об/об). Клетки разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора, проводя на льду восемь циклов озвучивания по 45 с. В случае Lc-LTP3 и Pru p 3 использовали полученный с помощью центрифугирования осветленный клеточный лизат. Металлохелатную хроматографию проводили на колонке с Ni^{2+} -сефарозой при скорости потока 0.7 мл/мин. Гибридные белки элюировали буферным раствором А, содержащим 0.5 М имидазола. Lc-LTP1 выделяли из телец включения, которые дважды промывали буфером А, содержащим 1% Тритон-Х100, после чего солиubilizировали в буфере А, содержащем 6 М гидрохлорид гуанидина. Металлохелатную хроматографию проводили в той же буферной системе, содержащей 6 М гидрохлорид гуанидина. Все элюаты диализовали против 3 л подкисленной воды (рН 3.0) в течение ночи при температуре 4°C. Полученные диализаты лиофильно высушивали. Гибридные белки расщепляли с помощью реакции с бромцианом. Для этого гибридные белки растворяли в 80% ТФУ в концентрации 10–20 мг/мл, добавляли 100-кратный молярный избыток бромциана и инкубировали в темноте в течение 16–20 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды, после чего упаривали образцы на вакуумном концентраторе. Очистку целевых белков проводили с помощью повторной металлохелатной хроматографии на той же колонке в той же буферной системе, содержащей 6 М гидрохлорид гуанидина. Последнюю стадию очистки рекомбинантных белков проводили на колонке Reprosil-Pur C_{18} -AQ (Dr. Maisch GmbH) в присутствии 0.1% ТФУ при скорости потока 2 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин. Рефолдинг очищенного Lc-LTP1 проводили в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ NaCl, 0.8 мМ

KCl, 1 мМ EDTA), содержащем 1 М мочевины, 0.8 М L-аргинин и 2 мМ GSH/0.2 мМ GSSG [10]. Для проведения рефолдинга рекомбинантный белок растворяли в этом буферном растворе в концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. После этого проводили ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C_{18} (Phenomenex) в присутствии 0.1% ТФУ, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин. Полученные на разных стадиях выделения фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ в триглицериновой системе по методу Лэммли [11].

Масс-спектрометрия, микросеквенирование по Эдману и КД-спектроскопия

Молекулярную массу рекомбинантных LTP определяли на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Reflect III (Bruker), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems). Спектры кругового дихроизма измеряли при комнатной температуре с помощью спектрополяриметра J-810 (Jasco) в кювете с оптическим путем 0.01 см в диапазоне длин волн 180–250 нм с шагом 1 нм, используя водные растворы рекомбинантных белков в концентрации 1 мг/мл.

Сыворотки и антитела

В работе использовали сыворотки пациентов ($n = 20$) с аллергией, собранные на базе Центра молекулярной диагностики ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Из их числа были отобраны сыворотки 9 пациентов с аллергическими реакциями на растительные продукты, содержащие специфические IgE к рекомбинантному Pru p 3. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки индивидов, не страдающих аллергией. Уровни общих IgE в сыворотках пациентов с аллергией определяли с помощью набора Total IgE HRP EIA (Dr. Fooke) согласно инструкции производителя.

Поликлональные анти-Lc-LTP2-антитела были получены в результате иммунизации кроликов. На первом этапе получения гипериммунной сыворотки кроликам подкожно вводили рекомбинантный Lc-LTP2 (150 мкг/кролика) с полным адъювантом Фрейнда, затем половинные дозы антигена с неполным адъювантом Фрейнда и на последнем этапе рекомбинантный белок в PBS. Поликлональные анти-Lc-LTP2-антитела очищали, используя метод дробного осаждения белков сульфатом аммония. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки, полученные от этих же кроликов до иммунизации.

Иммуноблоттинг

Экстракт из семян чечевицы получали согласно [8]. После проведения SDS-электрофореза в 15% ПААГ осуществляли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в буфере, содержащем 20% метанола и 0.1% SDS. На первом этапе мембрану инкубировали в 1% растворе обезжиренного молока в TBS. Мембрану промывали раствором TBST, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в растворе поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител в 1% растворе молока в TBS (разведение 1 : 200). После промывания мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в 1% растворе молока в TBS. Отмытую буфером TBST мембрану обрабатывали раствором TMB для мембран (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали, промывая мембрану водой, для удаления остатков субстрата.

Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA)

Рекомбинантные LTP (0.5 мкг) вносили в лунки 96-луночного планшета (Costar) в 50 мкл TBS и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки тем же буферным раствором TBST планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с 1% раствором BSA в TBS. Далее планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с сыворотками пациентов с аллергией, приготовленными с помощью серийных разведений (1 : 2–1 : 16) в TBS. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgE человека (Sigma) и инкубировали планшет при температуре 37°C в течение 1 ч. Связавшиеся антитела выявляли после промывки лунок TBST, используя TMB для ELISA (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали добавлением 4 н. H₂SO₄ и анализировали полученные данные, измеряя оптическую плотность в лунках при 450 нм.

При проведении ELISA с поликлональными кроличьими анти-Lc-LTP2-антителами после блокирования свободных сайтов связывания в тех же условиях планшет инкубировали с раствором поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител в TBS (разведения 1 : 500–1 : 64000) в течение 1 ч при 37°C. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в TBS и инкубировали планшет при 37°C в течение 1 ч. Детекцию проводили также с помощью TMB.

В экспериментах по ингибированию связывания специфических IgE проводили сорбцию меньшего

количества рекомбинантных белков (0.2 мкг), сыворотки пациентов предварительно инкубировали с рекомбинантным Pru p 3 в концентрации 0.02–200 мкг/мл в течение 3 ч при температуре 37°C.

Антимикробная активность

Тест-культуры бактерий *Agrobacterium tumefaciens* A281, *Clavibacter michiganensis* Ac-1144 и *Pseudomonas syringae* B-1546 инокулировали в жидкую среду LB и инкубировали при перемешивании при 30°C до достижения клетками A₆₀₀ = 1.0–1.5. Тест-культуры грибов *Aspergillus niger* F-2259, *Fusarium solani* F-142, *Alternaria alternata* F-3047, *Botrytis cinerea* F-3700 и *Neurospora crassa* F-184 выращивали на картофельно-сахарозном агаре при комнатной температуре до начала активной споруляции. В лунки 96-луночного планшета вносили аликвоты (110 мкл) бактериальных культур (4 × 10⁴ КОЕ/мл) или суспензии спор (10⁴ спор/мл) в питательной среде и добавляли по 10 мкл стерильных белковых растворов различной концентрации в 0.1% ТФУ. Каждый вариант теста проводили в трех повторах. Планшет инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C. Рост культуры оценивали, измеряя оптическую плотность в лунках при 620 нм. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1% ТФУ. Концентрации белков (IC₅₀), обеспечивающие 50% подавление роста культуры, определяли через 24 или 48 ч после начала инкубации бактериальных или грибковых культур соответственно. Прорастание спор и морфологию гиф оценивали с помощью светового инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus) спустя 12 и 24 ч после начала инкубации спор в жидкой питательной среде с растворами белков.

Связывание жирных кислот

Спектры флуоресценции были получены с помощью спектрофлуориметра F-4000 (Hitachi) при температуре 25°C. Спектральная ширина щели монохроматоров возбуждения и эмиссии составляла 5 нм. Флуоресценцию ТНС возбуждали при 320 нм и регистрировали в диапазоне 330–450 нм. Максимум интенсивности флуоресценции детектировали при 437 нм. Раствор ТНС в концентрации 3 мкМ в буферном растворе (175 мМ D-маннит, 0.5 мМ K₂SO₄, 0.5 мМ CaCl₂, 5 мМ MES, pH 7.0) в отсутствие или с добавлением стеариновой кислоты (до концентрации 65 мкМ) инкубировали в кювете в течение 1 мин при постоянном перемешивании, после чего снимали спектр флуоресценции. Затем добавляли рекомбинантные LTP до концентрации 2.5 мкМ, инкубировали в течение 2 мин и снимали спектры флуоресценции [12]. Результаты выражали в процентах от интенсивности флуоресценции комплекса



Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ LTP чечевицы и основного аллергена персика Pru p 3. Серым цветом выделены консервативные аминокислотные остатки, скобками показана организация дисульфидных связей. Сверху показаны α-спиральные участки структуры Lc-LTP2 [20]. Звездочками и красным цветом выделены аминокислотные остатки, входящие в конформационные эпитопы Pru p 3 [21]

белок–ТНС согласно формуле: $((F - F_0)/F_C) \times 100\%$, где F_0 – интенсивность флуоресценции ТНС в растворе; F и F_C – интенсивности флуоресценции комплекса белок–ТНС в присутствии и без добавления липида соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геномах растений липид-транспортирующие белки представлены семействами генов, кодирующих различные изоформы LTP. Обнаружение нескольких изоформ липид-транспортирующего белка в одном растении дает основания для более глубокого изучения биологической роли каждой из них. Было высказано предположение, что экспрессия генов тех или иных изоформ LTP определяется прежде всего влиянием на растение окружающей среды, а синтез множественных изоформ LTP является одним из элементов защиты от воздействия различных абиотических и биотических стрессовых факторов [13]. Это предположение получило подтверждение при изучении дифференциальной экспрессии генов изоформ LTP в различных органах и тканях растений в условиях абиотического и биотического стресса на примере кунжута [14], арабидопсиса [15], перца [16], клещевины [17], винограда [18] и томата [19]. При этом было показано, что для биосинтеза отдельных изоформ LTP в растениях характерна тканеспецифичность, и гены определенных изоформ экспрессируются на различных стадиях онтогенеза растения.

Ранее в проросших семенах чечевицы нами были обнаружены восемь белков, принадлежащих к классу липид-транспортирующих белков и названных Lc-LTP1–8 [8]. Было показано, что биосинтез выделенных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы Lc-LTP2, 4, 7, 8 происходит на ранней стадии развития проростков и, возможно, обусловлен участием этих белков в защите от патогенов или транспорте липидов при переходе растения в фазу активного метаболизма при прорастании семян. Биологическая роль изоформ Lc-LTP1, 3, 5, 6 пока остается невыясненной.

Структурно-функциональные свойства одного из LTP чечевицы, а именно Lc-LTP2, были подробно изучены. Этот белок имеет характерную для представителей класса LTP пространственную структуру, включающую четыре α-спирали [20]. Гидрофобные аминокислотные остатки в белке обращены внутрь глобулы и формируют гидрофобную впадину, способную вмещать в себя липидные лиганды. Lc-LTP2 связывает липиды, обладает антимикробной активностью и является основным аллергеном чечевицы, зарегистрированным под аббревиатурой Len с 3 [9].

Данная работа посвящена получению и сравнительному изучению структурно-функциональных и иммунологических свойств двух других изоформ LTP чечевицы. Для проведения сравнительного исследования были выбраны изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, наиболее заметно отличающиеся от Lc-LTP2 по аминокислотной последовательности (степень гомологии 72 и 77% соответственно) (рис. 2). Эти белки состоят из 93 аминокислотных остатков, включая восемь консервативно расположенных остатков цистеина, и имеют изоэлектрические точки в щелочной области pH (9.53 и 8.32 для Lc-LTP1 и Lc-LTP3 соответственно). В структуре этих белков присутствуют аминокислотные остатки, составляющие конформационные эпитопы доминантного аллергена класса LTP – Pru p 3 персика, что дает основание полагать, что обе изоформы LTP чечевицы обладают свойствами аллергенов.

Получение и характеристика рекомбинантных изоформ LTP чечевицы

Рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3 были получены способом, аналогичным описанному для Lc-LTP2 [9]. Выделение и очистку рекомбинантных белков проводили в несколько стадий, используя растворимую (Lc-LTP3) и нерастворимую (Lc-LTP1) клеточные фракции. Гибридный белок His8-TrxL-Lc-LTP3 в ходе экспрессии накапливался преимущественно в растворимой форме в цитоплазме. His8-TrxL-Lc-LTP1, имеющий изоэлектрическую точку в бо-

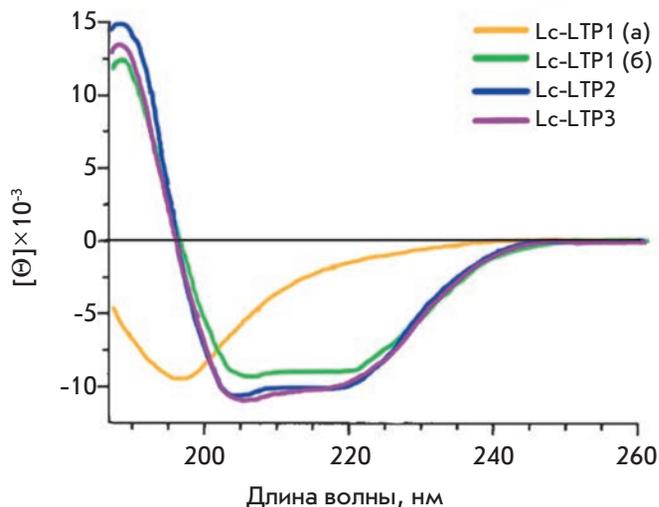


Рис. 3. КД-спектры рекомбинантных ЛТР чечевицы. а и б – КД-спектры рекомбинантного Lc-LTP1 до и после рефолдинга

лее щелочной области значений рН, накапливался как в растворимой, так и в нерастворимой формах. Однако в растворе в основном присутствовали укороченные в С-концевой области формы His8-TrxL-Lc-LTP1, которые, по-видимому, образовывались в результате протеолитического расщепления Lc-LTP1. В связи с этим экспрессию гибридного белка проводили при более высокой температуре и выделяли его из нерастворимой клеточной фракции. Очистку гибридных белков проводили с помощью металлохелатной хроматографии в неденатурирующих или денатурирующих условиях, используя для элюции ступенчатый градиент имидазола. Гибридные белки расщепляли бромцианом в кислой среде, после чего продукты реакции разделяли с помощью повторной металлохелатной хроматографии. Окончательную очистку рекомбинантных белков осуществляли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Вторичную структуру рекомбинантных белков изучали с помощью метода КД-спектроскопии. Спектр кругового дихроизма Lc-LTP3 был схож с КД-спектром Lc-LTP2 и представлял собой кривую, характерную для белков с высоким содержанием α-спиральной структуры. КД-спектр рекомбинантного Lc-LTP1 имел принципиально другую форму и указывал на то, что белок не структурирован (рис. 3). В связи с этим был проведен рефолдинг очищенного Lc-LTP1 при низкой температуре в мягких денатурирующих условиях в присутствии 1 М мочевины, L-аргинина, который препятствует агрегации белков, и пары окисленного и восстановленного глутатионов. Продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ. Анализ КД-спектра Lc-LTP1, прошедшего стадию

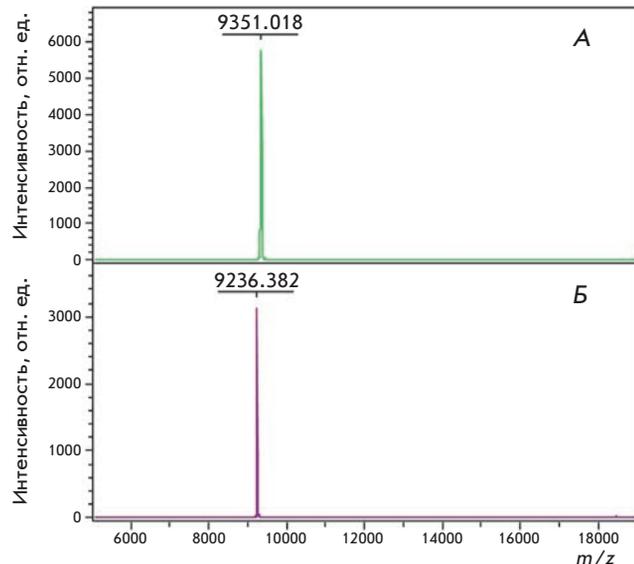


Рис. 4. MALDI-TOF-масс-спектры рекомбинантных Lc-LTP1 (А) и Lc-LTP3 (Б)

рефолдинга, показал, что белок принял характерную для ЛТР растений конформацию.

Препараты рекомбинантных белков анализировали с помощью SDS-электрофореза. Было показано, что в отсутствие β-меркаптоэтанола белки Lc-LTP1 и Lc-LTP3 находятся как в димерной, так и в мономерной форме, что характерно для белков класса ЛТР [9]. Добавление восстанавливающего агента приводило к разрыву дисульфидных связей и разрушению димеров. Гомогенность полученных препаратов и идентичность рекомбинантных ЛТР природным белкам подтверждены с использованием методов времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ и автоматического микросеквенирования по Эдману. Масс-спектрометрический анализ показал, что молекулярные массы рекомбинантных Lc-LTP1 (9351.02) и Lc-LTP3 (9236.38) соответствуют расчетным массам ЛТР, структура которых стабилизирована четырьмя дисульфидными связями (9350.93 и 9235.65 соответственно) (рис. 4). Измеренные значения m/z соответствуют массам протонированных молекулярных ионов $[M+H]^+$. Выход рекомбинантных белков составлял не менее 3 и 5 мг/л культуры в пересчете на чистые Lc-LTP1 и Lc-LTP3 соответственно. Рекомбинантный Prc p 3 получали так же, как Lc-LTP3, и его выход составил 4 мг/л культуры.

Функциональная активность рекомбинантных изоформ ЛТР чечевицы

Известно, что многие представители класса ЛТР обладают антимикробной активностью, и предполагаемой мишенью их антимикробного действия является цитоплазматическая мембрана [22]. Как полагают,

Таблица 1. Антимикробная активность рекомбинантных LTP чечевицы

| Микроорганизм | IC ₅₀ , мкМ | | |
|----------------------------------|------------------------|---------|---------|
| | Lc-LTP1 | Lc-LTP2 | Lc-LTP3 |
| Бактерии | | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 40 | 20–40 | 40 |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> | 40 | > 40 | > 40 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | > 40 | > 40 | > 40 |
| Грибы | | | |
| <i>Alternaria alternata</i> | 40 | > 40 | 40 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 5–10 | 10 | 10 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 20–40 | 10–20 | > 40 |
| <i>Fusarium solani</i> | 20–40 | > 40 | 40 |
| <i>Neurospora crassa</i> | 40 | 20–40 | 20–40 |

катионные LTP растений взаимодействуют с анионными компонентами цитоплазматической мембраны, что приводит к ее дестабилизации и нарушению проницаемости [20].

Сравнительное исследование антимикробной активности трех изоформ LTP чечевицы проведено с использованием грамотрицательных бактерий *A. tumefaciens* и *P. syringae* и грамположительной бактерии *C. michiganensis*, а также грибов *A. alternata*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. solani* и *N. crassa*. Установлено, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, обладают противогрибковой и слабовыраженной антибактериальной активностью и не характеризуются специфичностью антимикробного действия (табл. 1). Наиболее чувствительной к действию всех трех белков оказалась культура *A. niger*, возбудителя черной гнили растений. Показано, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, ингибируют прорастание спор фитопатогенных грибов, рост и развитие мицелия, но не влияют на морфологию гиф. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в степени выраженности антимикробной активности трех изоформ LTP чечевицы, несмотря на заметные различия в первичной структуре и кислотно-основных свойствах данных белков. На основании этого было высказано предположение, что не только неспецифическое электростатическое взаимодействие LTP с мембраной имеет значение для проявления антимикробного эффекта.

Помимо антимикробной активности практически все известные LTP растений обладают способностью связывать и переносить разнообразные липиды. Это обусловлено наличием в структуре LTP гидрофоб-

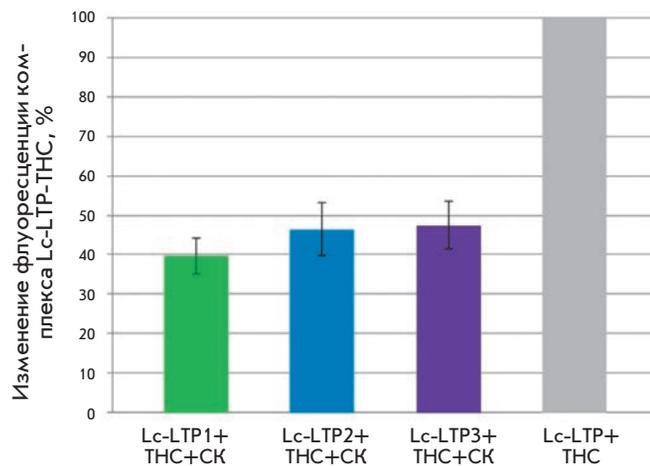


Рис. 5. Изменение флуоресценции комплексов рекомбинантных LTP и THC в присутствии стеариновой кислоты (СК). Lc-LTP соответствует одной из трех изоформ

ной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Растительные LTP связывают широкий спектр лигандов, включая жирные кислоты с длиной цепи C10–C18, ацильные производные кофермента А, фосфо- и галактолипиды, простагландин В₂, молекулы органических растворителей и некоторые лекарственные средства [23]. Эффективность связывания различных липидных лигандов зависит от размера гидрофобной впадины белка. Считается, что участие LTP во многих процессах в растении обусловлено их способностью связывать и переносить различные липиды.

Ранее методом ЯМР-спектроскопии было показано, что в структуре рекомбинантного Lc-LTP2 имеется гидрофобная впадина, обеспечивающая взаимодействие белка с молекулами димиристоилфосфатидилглицерина [20]. В настоящей работе было проведено исследование взаимодействия трех рекомбинантных LTP чечевицы со стеариновой кислотой с использованием флуоресцентного зонда THC, увеличение флуоресценции которой происходит при попадании ее в гидрофобное окружение. Было показано, что добавление к раствору THC неправильно свернутого Lc-LTP1, не прошедшего стадию рефолдинга, не влияло на интенсивность ее флуоресценции. Добавление же рекомбинантных Lc-LTP2 и Lc-LTP3, а также Lc-LTP1, прошедшего стадию рефолдинга, значительно увеличивало интенсивность флуоресценции THC. Это свидетельствовало об образовании комплексов THC с белками и о наличии в структуре всех трех LTP гидрофобной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Добавление каждо-

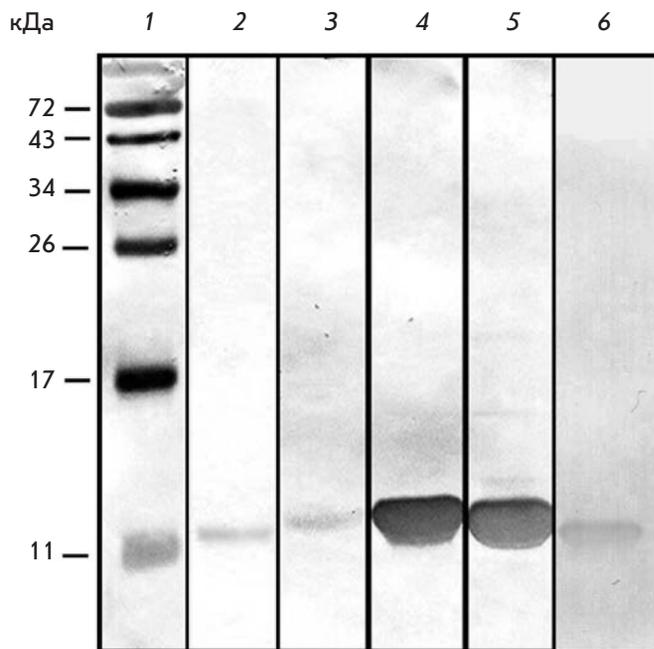


Рис. 6. Иммуноблотинг с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител: 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – экстракт семян чечевицы; 3–5 – рекомбинантные Lc-LTP1, 2, 3 соответственно; 6 – рекомбинантный Pru p 3

го из трех рекомбинантных ЛТР чечевицы к смеси ТНС и стеариновой кислоты приводило к менее значительному увеличению интенсивности флуоресценции и свидетельствовало о существовании конкуренции между молекулами жирной кислоты и ТНС за сайты связывания в исследуемых белках (рис. 5). Таким образом, показано, что все три изоформы обладают способностью связывать жирные кислоты. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в эффективности связывания жирной кислоты тремя белками, обусловленное, возможно, сходством размеров гидрофобных впадин трех изоформ ЛТР чечевицы.

Иммунологические свойства рекомбинантных изоформ ЛТР чечевицы

ЛТР из различных растений охарактеризованы как аллергены. Зачастую развитие аллергических реакций обусловлено перекрестной реактивностью между доминирующим аллергеном класса ЛТР Pru p 3 персика и гомологичными аллергенными белками из различных растительных продуктов и пыльцы. Ранее нами было показано, что Lc-LTP2 чечевицы, зарегистрированный в базе данных аллергенов IUIS как Len s 3, является пищевым аллергеном.

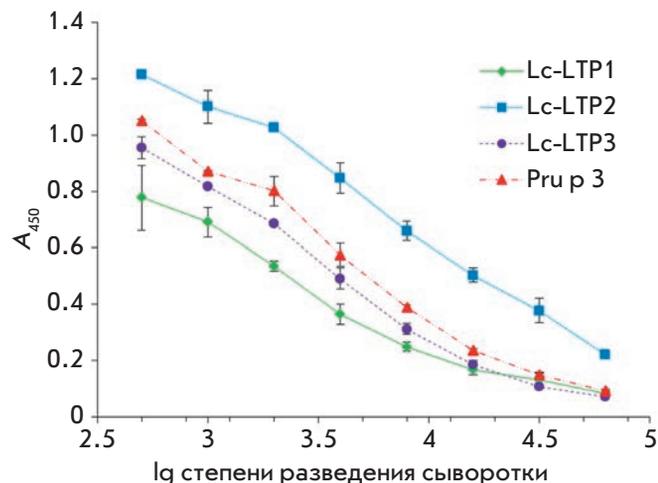


Рис. 7. ELISA с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител

Этот аллерген связывается со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3, что может быть причиной развития перекрестных аллергических реакций [9]. В представленной работе проведено сравнительное исследование иммунологических свойств и перекрестной реактивности двух других изоформ ЛТР чечевицы. Для этого были использованы полученные поликлональные кроличьи анти-Lc-LTP2-антитела и сыворотки пациентов с пищевой аллергией, содержащие специфические IgE к рекомбинантному Pru p 3.

Взаимодействие кроличьих поликлональных анти-Lc-LTP2 IgG с тремя изоформами ЛТР чечевицы и Pru p 3 персика было исследовано методами иммуноблотинга (рис. 6) и ELISA (рис. 7). Результаты иммуноблотинга, проведенного с использованием предварительно восстановленных рекомбинантных ЛТР, показали, что поликлональные кроличьи анти-Lc-LTP2-антитела связываются со всеми тремя изоформами ЛТР чечевицы и с Pru p 3 персика. С наибольшей эффективностью анти-Lc-LTP2-антитела взаимодействовали, как и следовало ожидать, с Lc-LTP2, хуже всего – с Lc-LTP1, хотя наименьшее структурное сходство с Lc-LTP2 имеет Pru p 3 персика (степень гомологии всего 55%). Результаты ELISA принципиально не отличались от результатов иммуноблотинга, хотя в данном случае использовались нативные белки. Наибольшая эффективность связывания с анти-Lc-LTP2-антителами наблюдалась в случае Lc-LTP2, наименьшая – в случае Lc-LTP1. Полученные результаты свидетельствовали

Таблица 2. Характеристика сывороток пациентов с пищевой аллергией

| № | Пол | Общие IgE, МЕ/мл | Специфические IgE* (ELISA), A ₄₅₀ | | | | Аллергизирующие продукты |
|---|-----|------------------|--|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| | | | Lc-LTP1 | Lc-LTP2 | Lc-LTP3 | Pru p 3 | |
| 1 | М | 794 | 1.4 ± 0.09 | 1.26 ± 0.19 | 1.28 ± 0.1 | 1.35 ± 0.14 | Орехи |
| 2 | Ж | 556 | 0.7 ± 0.12 | 0.77 ± 0.11 | 0.84 ± 0.07 | 0.85 ± 0.05 | Орехи |
| 3 | М | 525 | 1.08 ± 0.04 | 1.08 ± 0.11 | 1.07 ± 0.02 | 1.09 ± 0.03 | Орехи |
| 4 | Ж | 479 | 0.53 ± 0.05 | 0.57 ± 0.03 | 0.37 ± 0.03 | 0.82 ± 0.05 | Кунжут, соевые бобы |
| 5 | М | 417 | 0.28 ± 0.01 | 0.4 ± 0.02 | 0.32 ± 0.06 | 0.27 ± 0.01 | Орехи, фрукты |
| 6 | Ж | 407 | 0.77 ± 0.07 | 0.93 ± 0.02 | 0.29 ± 0.08 | 1.01 ± 0.07 | Орехи, томаты |
| 7 | Ж | 302 | 0.33 ± 0.03 | 0.37 ± 0.05 | 0.31 ± 0.1 | 0.33 ± 0.02 | Орехи |
| 8 | М | 71 | 0.6 ± 0.02 | 0.62 ± 0.02 | 0.4 ± 0.01 | 0.81 ± 0.02 | Горох |
| 9 | Ж | 25 | 0.46 ± 0.05 | 0.53 ± 0.14 | 0.45 ± 0.04 | 0.64 ± 0.02 | Орехи |

*Данные получены при использовании разведений сывороток 1 : 2.

о сходстве структурной организации всех LTP и, по крайней мере, о частичном сходстве их линейных и конформационных антигенных детерминант.

Способность рекомбинантных белков связываться со специфическими IgE из сывороток пациентов с аллергией на фрукты, орехи и бобовые была показана с помощью ELISA (табл. 2). Все три изоформы LTP чечевицы связывались со специфическими IgE, но, как показал анализ большинства сывороток пациентов, их иммунореактивность была ниже, чем у Pru p 3. IgE-иммунореактивность рекомбинантного Lc-LTP3 была ниже, чем у остальных двух изоформ. Это свидетельствовало о том, что все три изоформы LTP чечевицы обладают свойствами аллергенов, и что Lc-LTP3, по предварительным данным, является наименее аллергенной изоформой LTP чечевицы. Возможной причиной менее выраженной иммунореактивности Lc-LTP3 являлось то, что в его структуре присутствует меньшее, чем в других LTP чечевицы, число аминокислотных остатков (7 из 13), составляющих конформационные эпитопы Pru p 3 персика (рис. 2).

Перекрестная реактивность рекомбинантных изоформ LTP чечевицы была исследована с помощью ELISA с использованием в качестве ингибитора связывания с IgE рекомбинантного Pru p 3 (рис. 8). Ингибирование связывания с IgE наблюдалось в случае всех трех LTP чечевицы. Полученные результаты свидетельствовали о том, что изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, содержат эпитопы, сходные с основным аллергеном персика Pru p 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами получены рекомбинантные изоформы липид-транспортующего белка чечевицы – Lc-LTP1 и Lc-LTP3, и проведено сравнительное исследование структурно-функциональных и им-

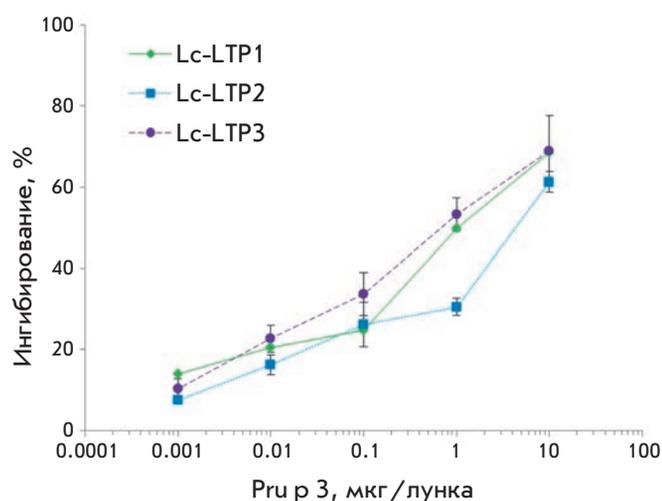


Рис. 8. Ингибирование рекомбинантным Pru p 3 связывания LTP чечевицы со специфическими IgE из сыворотки пациента № 3 с пищевой аллергией

мунологических свойств четырех липид-транспортующих белков. Несмотря на существенные различия в аминокислотных последовательностях трех изоформ LTP чечевицы, значительной разницы в их функциональных свойствах не выявлено. Показано, что все три белка содержат α-спиральные участки и характеризуются наличием гидрофобной впадины, обеспечивающей способность LTP связывать жирные кислоты. Все изоформы LTP чечевицы обладают антимикробной активностью, характеризующейся низкой специфичностью. Поиск природных лигандов различных изоформ LTP чечевицы, а также выявление факторов, влияющих на индукцию их биосинтеза, откроют путь к более глубокому пониманию функциональной роли множественности изоформ LTP.

В то же время выявлены различия в иммунореактивности трех изоформ ЛТР чечевицы. Показано, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и депонированный в базу данных аллергенов IUIS Len с 3, способны связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающие схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3. Однако у Lc-LTP3 иммунореактивность менее выражена, чем у других изоформ. Дальнейшее изучение структурной организации и аллергенных свойств Lc-LTP3 позволит установить ключевые аминокислотные остатки, замена которых приводит к снижению им-

мунореактивности растительных ЛТР, а также создаст предпосылки для получения гипоаллергенных аналогов липид-транспортирующих белков и их использования для аллерговакцинации. ●

Авторы выражают благодарность Г.А. Шипулину и сотрудникам Центра молекулярной диагностики ЦНИИЭ Роспотребнадзора за предоставленные сыворотки пациентов с пищевой аллергией.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-08-00956).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kader J.C. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 627–654.
- Sun J.-Y., Gaudet D., Lu Z.-X., Frick M., Puchalski B., Laroche A. // Mol. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. № 3. P. 346–360.
- Salcedo G., Sanchez-Monge R., Barber D., Diaz-Perales A. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1771. P. 781–791.
- Pastorello E.A., Pompei C., Pravettoni V., Farioli L., Calamari A.M., Scibilia J., Robino A.M., Conti A., Iametti S., Fortunato D., et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112. P. 775–783.
- Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Gonzalez-Muñoz M., Pacios L.F., Compés E., Garcia-Carrasco B., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Diaz-Perales A. // Mol. Immunol. 2009. V. 46. № 4. P. 722–728.
- Ferreira F., Briza P., Infuhr D., Schmidt G., Wallner M., Wopfner N., Thalhamer J., Achatz G. // Inflamm. Allergy Drug Targets. 2006. V. 5. № 1. P. 5–14.
- Ferreira F., Hirtenlehner K., Jilek A., Godnik-Cvar J., Breiteneder H., Grimm R., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breitenbach M., et al. // J. Exp. Med. 1996. V. 183. № 2. P. 599–609.
- Финкина Е.И., Баландин С.В., Серебрякова М.В., Потапенко Н.А., Тагаев А.А., Овчинникова Т.В. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 533–543.
- Finkina E.I., Akkerdaas J., Balandin S.V., Santos Magadán S., Knulst A., Fernandez-Rivas M., Asero R., van Ree R., Ovchinnikova T.V. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2012. V. 157. P. 51–57.
- Wan L., Zeng L., Chen L., Huang Q., Li S., Lu Y., Li Y., Cheng J., Lu X. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 48. № 2. P. 307–313.
- Laemmli U.R. // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
- Buhot N., Gomes E., Milat M.L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J., Delrot S., Coutos-Thevenot P., Blein J.P. // Mol. Biol. Cell. 2004. V. 15. № 11. P. 5047–5052.
- Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. // Trends Microbiol. 1995. V. 3. № 2. P. 72–74.
- Choi A.M., Lee S.B., Cho S.H., Hwang I., Hur C.-G., Suh M.C. // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. P. 127–139.
- Thoma S., Hecht U., Kippers A., Botella J., De Vries S., Somerville C. // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 35–45.
- Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. № 6. P. 915–928.
- Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. // Biochem. 1992. V. 3. P. 500–508.
- Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.H., Delrot S., Coutos-Thévenot P. // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. V. 16. № 5. P. 456–464.
- Trevino M.B., O'Connell M.A. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 1461–1468.
- Gizatullina A.K., Finkina E.I., Mineev K.S., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Telezhinskaya I.N., Balandin S.V., Shenkarev Z.O., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochim. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 439. № 4. P. 427–432.
- Pacios L.F., Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Compés E., Sánchez-Monge R., Palacín A., Salcedo G., Díaz-Perales A. // Mol. Immunol. 2008. V. 45. № 8. P. 2269–2276.
- Regente M.C., Giudici A.M., Villalain J., De la Canal L. // Lett. Appl. Mic. 2005. V. 40. P. 183–189.
- Carvalho A.O., Gomes V.M. // Peptides. 2007. V. 28. № 5. P. 1144–1153.

УДК 577.21

Использование терминаторов транскрипции для создания трансгенных линий клеток яичников китайского хомячка (СНО) со стабильным и высоким уровнем экспрессии репортерного гена

Н. Б. Гасанов, С. В. Тоцаков, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко*
Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5
*E-mail: mog@genebiology.ru
Поступила в редакцию 25.03.2015

РЕФЕРАТ Клеточные линии млекопитающих широко используются для получения клеток-продуцентов рекомбинантных белков. Обычно стабильные трансгенные клеточные линии содержат много встроеного экспрессионного вектора в одном месте генома. Транскрипция через трансген может быть одной из причин репрессии целевого гена при длительном культивировании таких клеточных линий. В настоящей работе с целью предотвращения транскрипции через трансген использовали известные терминаторы транскрипции вируса SV40, β - и γ -глобиновых генов человека. Показано, что терминаторы транскрипции увеличивают и стабилизируют экспрессию репортерного гена *EGFP* в трансгенных линиях клеток яичников китайского хомячка (СНО). Таким образом, терминаторы транскрипции могут использоваться для получения культур клеток млекопитающих с высоким и стабильным уровнем наработки целевого белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рекомбинантные белки, продукция белков в клеточных линиях, терминация транскрипции, инсуляторы, СНО.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РБ – рекомбинантный белок; СНО – культура клеток яичников китайского хомячка; S/MAR – последовательности ДНК, ассоциированные с белками ядерного матрикса; инсуляторы – регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором; UCOE – регуляторные элементы, содержащие сильные промоторы генов «домашнего хозяйства»; STAR – регуляторные элементы, которые защищают от HP1-зависимой репрессии; EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) – усиленный зеленый флуоресцентный белок; CMV – цитомегаловирус; SV40 – обезьяний вирус 40; HSV – вирус простого герпеса.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее число лекарственных препаратов получают в биореакторах, основанных на культурах клеток, и, прежде всего, клеток яичников китайского хомячка (СНО) [1, 2]. Однако основную проблему при производстве рекомбинантных белков в культурах клеток представляет крайне высокая себестоимость продукта. Один из способов оптимизации производства – усовершенствование векторов для получения трансгенов, что позволяет значительно снизить затраты в процессе получения и поддержания эффективных клеточных линий-продуцентов.

В биотехнологии наибольшее распространение для получения клеточных линий-продуцентов це-

левых белков получил метод трансфекции линейаризованной плазмидной ДНК [3, 4]. С помощью этого метода можно получить клеточные линии, которые содержат много копий экспрессионного вектора, обычно встроенных в одно, реже – в несколько геномных сайтов. Для экспрессии трансгена обычно применяют вирусные промоторы – цитомегаловирусный (CMV) и ранний промотор вируса SV40, а также сильные клеточные промоторы генов «домашнего хозяйства» [5].

С целью повышения эффективности трансфекции и стабильности экспрессии трансгена с начала 1990-х годов широко используют последовательности ДНК, обычно А/Т-богатые, которые, как показано в экспериментах *in vitro*, взаимодействуют с фрак-

цией ядерного матрикса (MAR, matrix attachment region) [6–8]. Существующая модель предполагает, что MAR-элементы, взаимодействуя с белками ядерного скелета, снижают зависимость уровня экспрессии генов, фланкированных MAR, от негативного эффекта окружающего хроматина.

Кроме этого, для защиты транскрипции трансгена от репрессии и негативного эффекта окружающего генома широко используют известные инсуляторы [9–11]. В биотехнологии наиболее часто применяют инсулятор HS4 (1.2 т.п.н.), найденный на границе β -глобинового домена в геноме курицы. Обычно в конструкцию перед целевым геном встраивают две копии инсулятора HS4. В некоторых случаях используют комбинации известных MAR и HS4-инсулятора либо мультимеризуют его коровую часть (500 п.н.) [9]. Такие элементы увеличивают как эффективность получения трансгенов, так и уровень экспрессии самого трансгена. Однако далеко не во всех культурах клеток и организмах HS4-инсулятор работает эффективно.

В биотехнологии также используют протяженные участки ДНК, включающие промоторы генов «домашнего хозяйства» (UCOE) [12, 13], и регуляторные элементы, обладающие способностью блокировать распространение зон гетерохроматина [12, 14].

В целом, можно констатировать, что пока не найдены универсальные регуляторные элементы с понятным механизмом действия, которые можно эффективно использовать в составе векторных конструкций всех типов, предназначенных для получения высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов различных белков. Очевидно, что механизмы супрессии «чрезмерной» транскрипции должны существовать даже у самых сильных промоторов. Один из таких механизмов ограничения транскрипции – РНК-интерференция [15, 16]. Часто эффекты репрессии при встройке трансгена связаны с транскрипцией, проходящей через трансген. Например, транскрипция через энхансер приводит к инактивации его активности [17]. Длинные некодирующие РНК могут также рекрутировать на регуляторные элементы репрессивные комплексы [18]. На основе фактов, указывающих на негативную роль транскрипции, идущей через регуляторные элементы, в экспрессии трансгена, можно предположить, что прерывание транскрипции на границах трансгена должно позитивно влиять на процесс стабилизации экспрессии трансгена. В то же время только часть исследованных инсуляторов эффективно терминирует транскрипцию [19].

В данной работе с целью тестирования роли прерывания транскрипции в защите экспрессии трансгена использовали последовательности хорошо из-

ученных терминаторов транскрипции из β - (β t) и γ - (γ t) глобиновых генов [20, 21]. В качестве контроля использовали две копии наиболее хорошо описанного инсулятора HS4 (2×Ins) из β -глобинового локуса кур [22]. Показано, что терминаторы транскрипции способны значительно увеличивать стабильность экспрессии репортерного гена в клеточных пулах. При выведении отдельных стабильных клеточных линий конструкции с терминаторами характеризовались более высоким уровнем наработки продукта трансляции репортерного гена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание конструкций

Для получения серии конструкций в вектор pEGFPN1 по сайту рестрикции PciI, расположенному перед геном *EGFP* выше цитомегаловирусного промотора на расстоянии 640 п.н. от точки старта транскрипции, встраивали различные последовательности: две tandemные копии коровой части инсулятора HS4 из β -глобинового локуса курицы (2×Ins) длиной 476 п.н., терминатор транскрипции SV40 (SV40pA) длиной 868 п.н., терминатор транскрипции из β -глобинового локуса человека (β t) длиной 1130 п.н., комбинированный элемент, состоящий из β t и 2×Ins. Для получения конструкции β t_EGFP_ γ t в конструкцию β t_EGFP по сайту рестрикции AflIII был встроены терминатор из γ -глобинового гена человека (γ t) длиной 1336 п.н.

Получение трансфицированных клеточных линий

Экспрессию репортерного гена анализировали на культуре клеток яичников китайского хомячка (CHO-K1), наиболее широко применяемой в биотехнологической практике для наработки целевых белков.

Клетки CHO-K1 культивировали на среде DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 35 мг/л L-пролина, а также коммерческий антибиотик Мусокилл-АВ (PAA Laboratories) в рабочей концентрации. Клетки пересеивали 1 раз в 5 дней при концентрации 10^5 клеток/см² с разведением 1 : 20. Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ и высокой влажности. Культуру клеток трансфицировали рекомбинантными плазмидами. С целью более эффективной интеграции трансгенной конструкции плазмиды линейаризовали рестриктазой AraLI. Трансфекцию проводили согласно следующему протоколу. Клетки, достигшие 70–80% от монослоя (8×10^4 клеток/см²), промывали культуральной средой, не содержащей сыворотки. Подготавливали смесь для трансфекции: 3–4

мкг линейризованной плазмидной ДНК смешивали с 375 мкл культуральной среды, не содержащей сыворотки. В отдельной пробирке с таким же количеством аналогичной среды смешивали коммерческий трансфицирующий реагент Lipofectamine 2000, количество которого рассчитывали исходя из соотношения 3 мкл реактива на 1 мкг плазмидной ДНК. После этого растворы объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Трансфекционную смесь наслаивали на промытые клетки. Через 4–6 ч после начала трансфекции трансфекционную смесь заменяли на культуральную среду DMEM с сывороткой.

Анализ уровня экспрессии репортерного гена оценивали по интенсивности флуоресценции на вторые сутки после трансфекции (36–48 ч) при помощи проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant Analyzer VYB (Miltenyi Biotec). В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки линии CHO-K1.

Цитофлуориметрический анализ

Для проведения цитофлуориметрического анализа клетки промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали трипсином и снимали с чашек Петри. Затем дважды отмывали от трипсина и тщательно ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Полученную суспензию (10^6 клеток в 1 мл буфера) переносили в 5 мл круглодонные пробирки.

Напряжение каналов проточного цитофлуориметра подбирали таким образом, чтобы не учитывать аутофлуоресценцию нетрансфицированных клеток. После проведения калибровки все образцы измеряли при постоянных значениях напряжений. Так, если в клетках детектировалась флуоресценция EGFP, на логарифмической шкале по соответствующему каналу фиксировалось появление клеток в области, превышающей значение «10», и все количественные значения уровня экспрессии гена измеряли именно в этой области.

Поддержание пулов трансфицированных клеток

После проведения трансфекции пулы клеток культивировали согласно приведенному выше протоколу. Клетки, не содержащие трансген, удаляли путем селекции пулов трансфицированных клеток при помощи коммерческого антибиотика генетина (Geneticin, Invitrogen), вводимого в концентрации 800 мкг/мл. Поскольку в результате подавления транскрипционной активности трансгена выработка продукта гена устойчивости к антибиотику с течением времени снижается, после культивирования клеток в течение 77 сут концентрация антибиотика была постепенно снижена до 200 мкг/мл.

Получение индивидуальных клонов

Пулы культивируемых клеток снимали с планшетов и разводили в 10 мл культуральной среды. После этого подсчитывали концентрацию клеток при помощи автоматического счетчика Scepter (Millipore) и разводили их таким образом, чтобы в 1 мл среды содержалось 2–3 клетки. Полученную суспензию переносили в 24-луночные планшеты (1 мл на лунку).

После 2 недель культивирования на среде DMEM, содержащей антибиотик Geneticin в концентрации 800 мкг/мл, проводили цитофлуориметрический анализ выживших клонов. Дальнейшее поддержание полученных линий и определение уровня экспрессии EGFP осуществляли согласно методике для пулов трансфицированных клеток. Интенсивность флуоресценции EGFP измеряли через каждые 15 сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении потенциальной роли терминаторов транскрипции в стабилизации уровня экспрессии трансгена в CHO-клетках в качестве репортерного использовали ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) под контролем CMV-промотора. Все опытные конструкции сравнивали с контролем, плазмидой pEGFPN1 (Clontech), содержащей в своем составе ген EGFP под контролем CMV-промотора (CMVpr) и терминатора транскрипции вируса SV40 (SV40pA) (конструкция EGFP на рис. 1). Помимо репортерного гена, данная плазида содержит ген устойчивости к антибиотику неомицину (Neo^R) под контролем промотора SV40 (SV40pr) и терминатора транскрипции гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVpA). В данном случае ген неомицинустойчивости необходим для селекции трансфицированных клеток.

С целью оценки влияния процесса прерывания транскрипции, инициируемой перед встроенным трансгеном, на экспрессию репортерного гена использовали хорошо изученные терминаторы транскрипции гена β-глобина (βt) и SV40pA. В конструкциях (SV40_EGFP и βt_EGFP) эти терминаторы были встроены в прямой ориентации непосредственно выше CMV-промотора (рис. 1). Для полной изоляции репортерного гена от транскрипции, инициируемой в окружающем хроматине, создана производная конструкции βt_EGFP (рис. 1), в которой в дополнение к β-глобиновому терминатору с 3'-стороны репортерного гена EGFP был встроена в обратной ориентации терминатор транскрипции из гена γ-глобина (βt_EGFP_γt). В такой конструкции репортерный ген защищен с обеих сторон от транскрипции, инициируемой из окружающего хроматина.

Для сравнения эффективности терминаторов транскрипции с известными на данный момент ре-

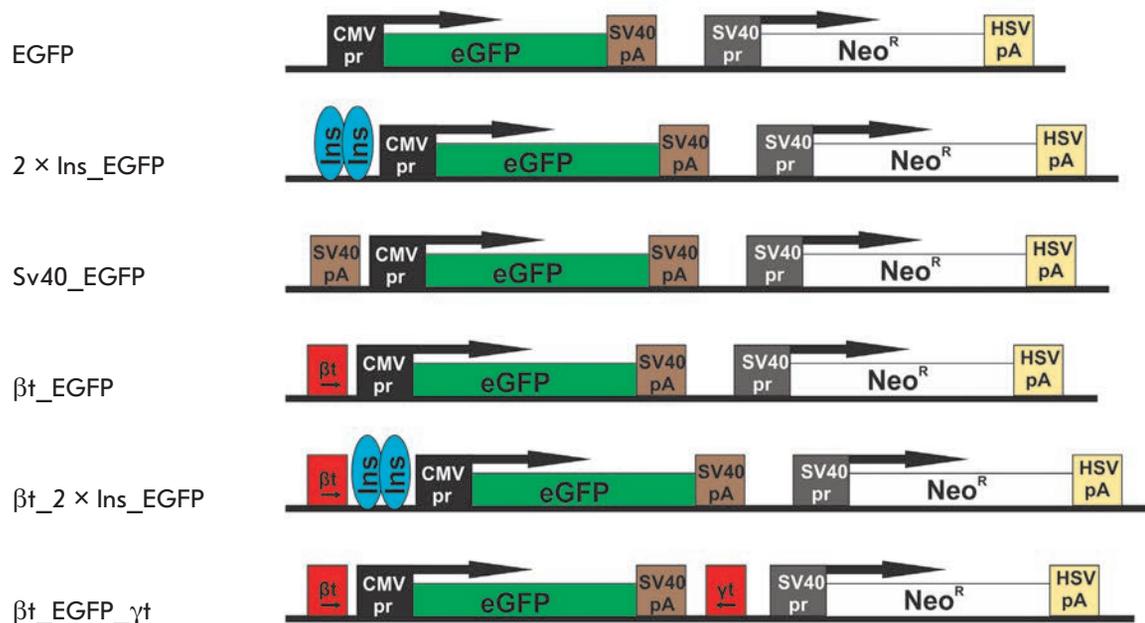


Рис. 1. Схемы конструкций, использованных для тестирования ДНК-элементов в культуре клеток CHO-K1. EGFP – контрольная плаزمида рEGFPN1, в которой ДНК-элементы отсутствуют. 2×Ins_EGFP – контрольная конструкция, в которой выше цитомегаловирусного промотора встроены две копии инсультатора из β-глобинового локуса кур. SV40_EGFP, βt_EGFP, βt_2×Ins_EGFP – конструкции с терминаторами транскрипции, встроеными выше цитомегаловирусного промотора. βt_EGFP_γt – конструкция с терминаторами транскрипции, окружающими репортерный ген EGFP. Промоторы отмечены черным (цитомегаловирусный) и серым (вируса SV40) квадратами, терминаторы транскрипции – коричневыми (SV40), желтыми (тимидинкиназа вируса HSV), красными (β- и γ-глобиновые гены) квадратами. Гены изображены зелеными (EGFP) и белыми (неомициностойчивость) прямоугольниками, стрелки показывают направление транскрипции. Инсультаторы представлены в виде голубых овалов

гуляторными элементами, стабилизирующими экспрессию трансгена в CHO-клетках, использовали элемент, состоящий из двух копий коровой части инсультатора HS4, встроеного непосредственно перед CMV-промотором (2×Ins_EGFP, рис. 1). Наконец, для изучения кооперативного эффекта разных по функциям регуляторных элементов, инсультатора и терминатора транскрипции, была создана конструкция βt_2×Ins_EGFP, в которой перед двумя копиями инсультатора встроено β-глобиновый терминатор (рис. 1).

Уровень экспрессии репортерного гена при трансфекции разных вариантов конструкции определяли на культуре клеток яичников китайского хомячка (CHO-K1), наиболее широко применяемой в биотехнологической практике для наработки целевых белков. При этом трансфекцию проводили традиционным методом с помощью липосом.

Для определения степени подавления трансгена в пулах клеток, трансфицированных контрольными (рEGFP_N1 и 2×Ins_EGFP) и экспериментальными

(SV40_EGFP, βt_pEGFP, βt_2×Ins_EGFP, βt_EGFP_γt) конструкциями, каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии оценивали уровень экспрессии репортерного гена (рис. 2). Средний уровень экспрессии гена EGFP в пуле клеток в определенный момент времени определяли по процентному содержанию клеток, значение интенсивности флуоресценции которых было больше «10» по логарифмической шкале, т.е. клеток, нарабатывающих значимое количество данного белка. При этом в данном эксперименте показателем эффективности того или иного регуляторного элемента для достижения высокого и стабильного уровня наработки белка служило отношение процентного содержания клеток, экспрессирующих EGFP, в пуле клеток, несущих конструкцию с данным элементом, к процентному содержанию экспрессирующих EGFP клеток с контрольной плазмидой (EGFP).

Результаты определения уровня экспрессии EGFP на протяжении 150 сут культивирования суммарной популяции трансфицированных клеток (что соот-

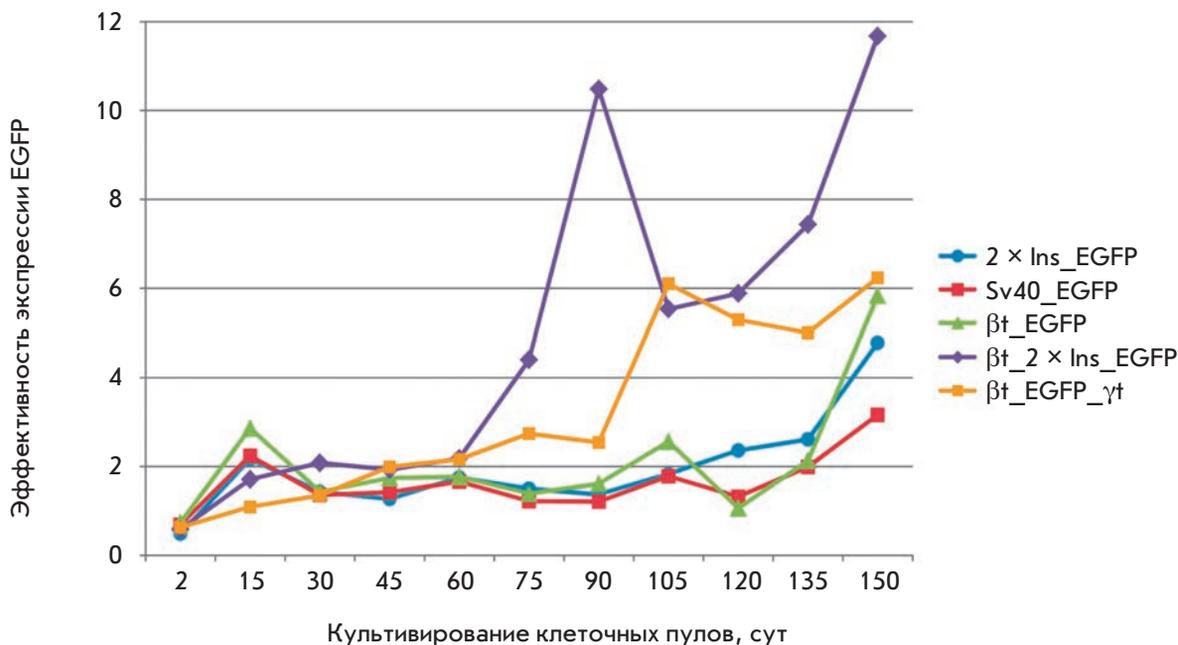


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии репортерного гена *EGFP* в клеточных пулах, трансфицированных конструкциями. На гистограмме представлены результаты измерения флуоресценции стабильных клеточных пулов каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии. На оси абсцисс – временные промежутки измерений. На оси ординат – эффективность экспрессии *EGFP*, определенная как отношение процентного содержания клеток, экспрессирующих *EGFP*, в пуле клеток, несущих конструкцию с данным элементом ($2 \times \text{Ins_EGFP}$, SV40_EGFP , βt_EGFP , $\beta t_2 \times \text{Ins_EGFP}$, $\beta t_EGFP_ \gamma t$), к процентному содержанию экспрессирующих *EGFP* клеток с контрольной плазмидой (*EGFP*). Средний уровень экспрессии гена *EGFP* в пуле клеток в определенный момент времени оценивали по процентному содержанию клеток с значением интенсивности флуоресценции больше «10» по логарифмической шкале в соответствующем канале. На гистограмме каждая кривая соответствует отдельной конструкции

ветствует примерно 30 пассажирам) свидетельствуют о том, что использование терминатора транскрипции перед промотором целевого гена значительно повышает эффективность наработки белка в ходе длительного культивирования: более чем в 3 раза – с терминатором SV40, в 5 раз – с терминатором βt в конце периода испытаний (рис. 2). Аналогичный эффект оказывал и регуляторный элемент, состоящий из двух копий инсуляторов.

Несколько более значительное увеличение уровня экспрессии *EGFP* наблюдалось в пуле клеток, трансфицированных плазмидой $\beta t_EGFP_ \gamma t$, в которой репортерный ген окружен терминаторами транскрипции (рис. 2). Таким образом, защита репортерного гена (с двух сторон) от транскрипции, инициируемой вне трансгена, повышает стабильность и эффективность экспрессии. Наконец, самые лучшие результаты (12-кратное увеличение) получены при комбинации терминатора транскрипции и двух копий инсулятора в плазмиде $\beta t_2 \times \text{Ins_EGFP}$ (рис. 2). Можно сделать вывод, что два регуляторных элемента с разным механизмом действия аддитивно влияют

на стабильность и эффективность экспрессии репортерного гена.

На практике рекомбинантные белки нарабатывают, отбирая стабильные клеточные линии, полученные из одной трансфицированной клетки и, следовательно, имеющие однородный генотип, что позволяет исключить влияние различных негативных факторов и выделить самый эффективный клон с оптимальным местом интеграции конструкции в геноме.

Из суммарных клеточных популяций методом лимитирующих разведений после 30 сут культивирования были получены индивидуальные клеточные клоны. Основным количественным показателем экспрессионной активности репортерного гена в данном случае служила медиана распределения клеток по интенсивности флуоресценции.

Исходно получили 10 индивидуальных клонов с конструкцией *EGFP*, 17 – с конструкцией $2 \times \text{Ins_EGFP}$, 10 – с конструкцией SV40_EGFP и 10 – с конструкцией βt_EGFP . Из них достаточно высокий уровень экспрессии *EGFP* имели два клон с кон-

Результаты анализа временного профиля экспрессии гена *EGFP* в индивидуальных клеточных клонах

| Клон | Интенсивность флуоресценции (медиана распределения), 30 сут | Интенсивность флуоресценции (медиана распределения), 90 сут | Снижение активности экспрессии | Среднее значение |
|-----------------|---|---|--------------------------------|------------------|
| EGFP #1 | 23.71 | 2.35 | 0.1 | 0.1 |
| EGFP #2 | 16.11 | 1.7 | 0.11 | |
| 2 × Ins_EGFP #1 | 69.78 | 9.73 | 0.14 | 0.13 |
| 2 × Ins_EGFP #2 | 116.52 | 3.59 | 0.03 | |
| 2 × Ins_EGFP #3 | 103.66 | 16.6 | 0.16 | |
| 2 × Ins_EGFP #4 | 33.08 | 5.99 | 0.18 | |
| 2 × Ins_EGFP #5 | 77.74 | 10.55 | 0.14 | |
| SV40_EGFP #1 | 67.93 | 13.1 | 0.19 | 0.76 |
| SV40_EGFP #2 | 339.82 | 82.79 | 0.24 | |
| SV40_EGFP #3 | 50.25 | 134.45 | 2.68 | |
| SV40_EGFP #4 | 7.04 | 2.37 | 0.34 | |
| SV40_EGFP #5 | 3.31 | 1.24 | 0.37 | |
| βt_EGFP #1 | 78.44 | 15.54 | 0.2 | 2.07 |
| βt_EGFP #2 | 79.86 | 19.63 | 0.25 | |
| βt_EGFP #3 | 76.35 | 14.46 | 0.19 | |
| βt_EGFP #4 | 2.19 | 13.34 | 6.09 | |
| βt_EGFP #5 | 15.75 | 56.74 | 3.6 | |

струкцией EGFP, пять клонов – 2×Ins_EGFP, пять – SV40_EGFP и шесть – βt_EGFP.

Необходимо отметить, что клоны с контрольной конструкцией исходно экспрессировали белок EGFP значительно слабее, чем клоны с конструкциями 2×Ins_EGFP, SV40_EGFP, βt_EGFP (см. таблицу).

После культивирования в течение 2.5 месяцев уровень экспрессии *EGFP* в стабильных клеточных клонах с конструкциями EGFP и 2×Ins_EGFP снизился приблизительно в 10 раз. При этом экспрессионная активность клонов, содержащих конструкции SV40_pEGFP и βt_pEGFP, составила в среднем около 75% от исходной.

Результаты измерения стабильных клеточных пулов показали, что наиболее эффективные клетки, характеризующиеся стабильной экспрессией репортерного гена, отбираются приблизительно после 90 сут культивирования. Поэтому с целью более детального изучения клонов, полученных из стабилизированной популяции клеток, провели еще одну процедуру выведения индивидуальных клеточных клонов из суммарных популяций методом лимитирующих разведений после 90 сут культивирования стабильных пулов.

Как и в предыдущем эксперименте, основным количественным показателем экспрессионной активности репортерного гена служила медиана распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Исходно получено по 12 индивидуальных клонов с конструкциями EGFP, 2×Ins_EGFP, βt_

EGFP, βt_2×Ins_EGFP, βt_EGFP_γt. К концу эксперимента (300 суток культивирования клеточного клона) часть клонов погибла, поэтому представлены данные для пяти клонов с конструкцией EGFP, 12 – с конструкцией 2×Ins_EGFP, 9 – с βt_EGFP, 9 – с βt_2×Ins_EGFP, пять – с βt_EGFP_γt (рис. 3). Результаты измерений показывают, что полученные клоны EGFP имеют стабильный, но крайне низкий уровень флуоресценции (значения в среднем колеблются около 10). Чуть выше значения у клонов 2×Ins_EGFP, среди которых только один клон имеет низкую активность, в то время как остальные попадают в район от 10 до 100. Клоны βt_EGFP характеризуются еще более высокими средними значениями по сравнению с 2×Ins_EGFP. Кроме этого, один из клонов βt_EGFP показал сверхвысокие уровни флуоресценции (попал в район от 100 до 1000). Клоны βt_2×Ins_EGFP неожиданно разделились на две группы: одна (два клона) имела низкие значения флуоресценции, сравнимые со значениями клонов с конструкцией EGFP, тогда как у второй группы значения оказались гораздо более высокими (около 100), в среднем большими, чем у клонов 2×Ins_EGFP и βt_EGFP. Возможно, полученные различия в результатах связаны с использованием более сложной комбинации регуляторных элементов, нестабильной в определенных участках генома. Сходным образом проявилась активность и у клонов βt_EGFP_γt, среди которых один клон имел крайне низкий уровень флуоресценции, при этом остальные оказались в области высоко-

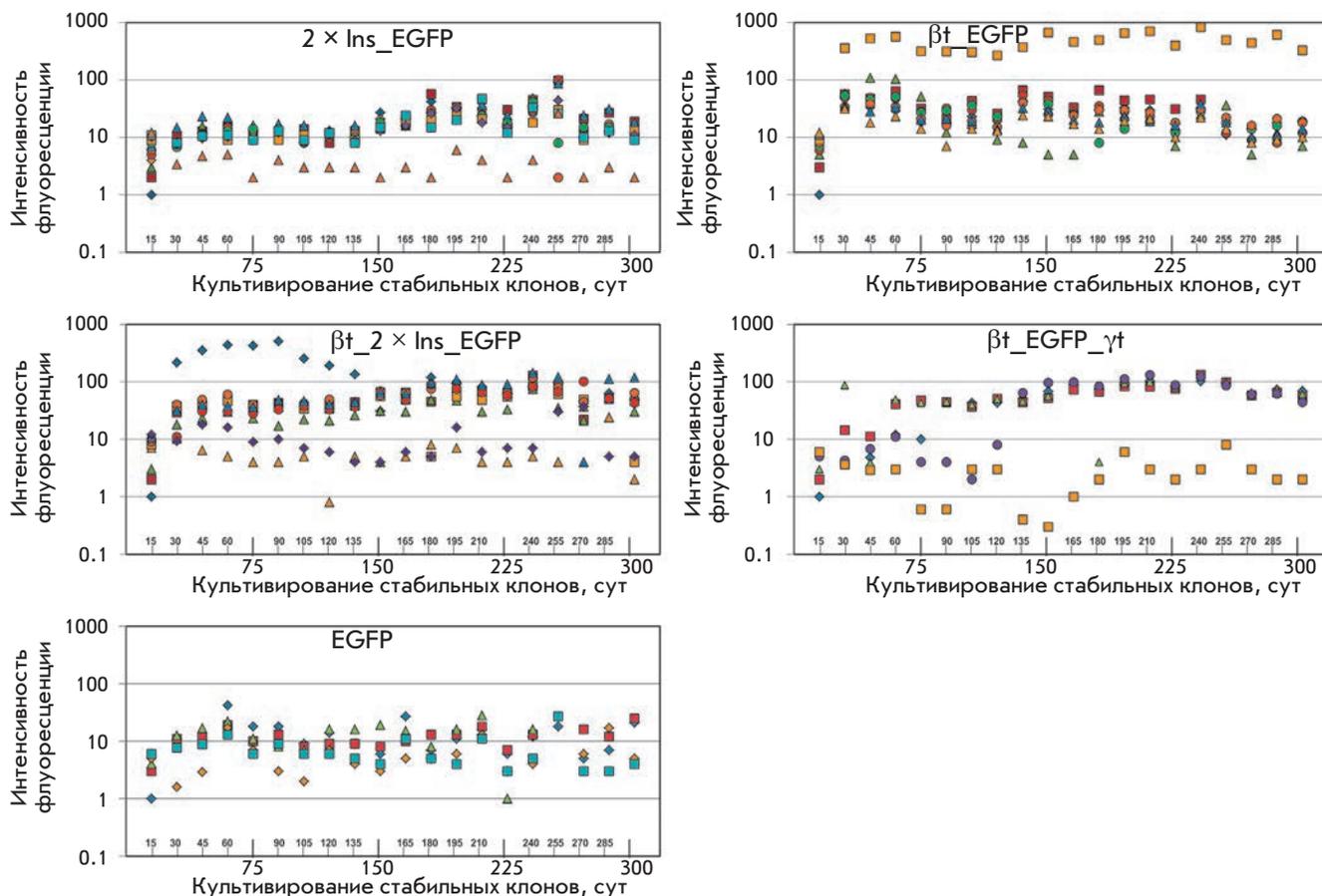


Рис. 3. Анализ уровня экспрессии репортерного гена *EGFP* в стабильных клеточных клонах, выведенных из трансфицированных пулов клеток. На гистограммах представлены результаты измерения флуоресценции стабильных клеточных клонов каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии. На оси абсцисс приведены временные промежутки измерений. На оси ординат – логарифмическая шкала интенсивности флуоресценции *EGFP*, которую определяли как медиану распределения. Средний уровень экспрессии гена *EGFP* в пуле клеток в определенный момент времени оценивали как величину, прямо пропорциональную связанную с интенсивностью флуоресценции *EGFP*. Каждая точка на гистограмме соответствует отдельному клеточному клону

кой флуоресценции (в районе 100). По результатам данной серии опытов можно сделать вывод о высокой эффективности терминаторов транскрипции в процессе установления и поддержания высокого уровня синтеза целевого белка. При этом комбинированный элемент (терминатор, соединенный с инсулятором) и вариант с репортерным геном, окруженным терминаторами, характеризуются более высокими показателями эффективности синтеза целевого белка. Однако эти конструкции требуют более внимательного отбора клонов, так как некоторые клоны оказались по неизвестным причинам неэффективными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе показано, что терминаторы транскрипции, которые потенциально могут

изолировать трансген от транскрипционных сигналов, обладают способностью поддерживать уровень транскрипции трансгена на стабильно высоком уровне на протяжении достаточно длительного периода культивирования клеточных линий СНО-К1. Установлено также, что терминатор более эффективно по сравнению с инсулятором поддерживает стабильный уровень экспрессии трансгена в клонах. Более того комбинация терминатора транскрипции и инсулятора обладает аддитивным эффектом, усиливающим и стабилизирующим экспрессию трансгена. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. P. 917–930.
2. Hacker D.L., De Jesus M., Wurm F.M. // *Biotech. Advances.* 2009. P. 1023–1027.
3. Khan K.H. // *Adv. Pharm. Bull.* 2013. V. 3. P. 257–263.
4. Browne S.M., Al-Rubeai M. // *Trends Biotech.* 2007. V. 25. P. 425–432.
5. Lai T., Yang Y., Ng S.K. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013. V. 6. P. 579–603.
6. Kim J.M., Kim J.S., Park D.H., Kang H.S., Yoon J., Baek K., Yoon Y. // *J. Biotech.* 2004. V. 107. P. 95–105.
7. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. // *Biotech. Bioeng.* 2005. V. 91. P. 1–11.
8. Harraghy N., Gaussin A., Mermod N. // *Curr. Gene Ther.* 2008. V. 8. P. 353–366.
9. Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C.M. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 796–807.
10. Kwaks T.H., Otte A.P. // *Trends Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 137–142.
11. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Y.M., Georgiev P.G. // *Acta Naturae*. 2013. V. 5. № 1(16). P. 33–46.
12. Palazzoli F., Bire S., Bigot Y., Bonnin-Rouleux F. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 593–597.
13. Antoniou M., Harland L., Mustoe T., Williams S., Holdstock J., Yague E., Mulcahy T., Griffiths M., Edwards S., Ioannou P.A., et al. // *Genomics*. 2003. V. 82. P. 269–279.
14. Kwaks T.H.J., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R.G., Satijn D.P., Brons J.F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A.L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 553–558.
15. Saxena A., Carninci P. // *BioEssays*. 2011. V. 33. P. 830–839.
16. Martjanov I., Ramadass A., Barros A.S., Chow N., Akoulitchev A. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 666–670.
17. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenetics Chromatin*. 2013. V. 6. P. 31.
18. Khalil A.M., Guttman M., Huarte M., Garber M., Raj A., Rivea M.D., Thomas K., Presser A., Bernstein B.E., van Oudenaarden A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 11667–11672.
19. Silicheva M., Golovnin A., Pomerantseva E., Parshikov A., Georgiev P., Maksimenko O. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 39–47.
20. Nojima T., Dienstbier M., Murphy S., Proudfoot N.J., Dye M.J. // *Cell Rep.* 2013. V. 25. P. 1080–1092.
21. Plant K.E., Dye M.J., Lafaille C., Proudfoot N.J. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 3276–3285.
22. Hanawa H., Yamamoto M., Zhao H., Shimada T., Persons D.A. // *Mol. Therapy*. 2009. V. 17. P. 667–674.

УДК 612.816

В синхронной и асинхронной секреции медиатора принимают участие одни и те же синаптические везикулы

П. Н. Григорьев, А. Л. Зефирова*

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: zefiroval@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.02.2015

РЕФЕРАТ В опытах на двигательных нервных окончаниях кожно-грудинной мышцы лягушки с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения постсинаптических сигналов и флуоресцентной конфокальной микроскопии изучали процессы вызванной секреции медиатора и экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при высокочастотном раздражении (20 имп/с) в присутствии во внеклеточном растворе различных двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+}). В электрофизиологических экспериментах в Ca -растворе регистрировалась практически только синхронная секреция медиатора, в Sr -растворах – высокая интенсивность как синхронной, так и асинхронной секреции, а в Ba -растворе наблюдалось практически только асинхронное выделение медиатора. В опытах с флуоресцентным красителем FM 1-43 показано, что везикулы, прошедшие цикл экзоцитоза–эндоцитоза при синхронной секреции медиатора (Ca -растворы), способны вовлекаться в асинхронный экзоцитоз в Ba -растворах. И, наоборот, везикулы, которые первоначально участвовали в асинхронной секреции (Ba -растворы), способны в последующем участвовать в синхронной секреции (Ca -растворы). В экспериментах с изолированной загрузкой красителем везикул рециклирующего и резервного пулов показано, что оба пула везикул принимают участие как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора. Сделано заключение, что источником для обоих видов вызванной секреции медиатора служат одни и те же синаптические везикулы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулярные пулы, вызванная синхронная и асинхронная секреция медиатора, двигательное нервное окончание, ионы Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , экзоцитоз и эндоцитоз синаптических везикул.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПКП – потенциал концевой пластинки.

ВВЕДЕНИЕ

Секреция медиатора в химическом синапсе осуществляется порциями (квантами) посредством слияния мембраны синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. Процесс слияния может происходить в покое (спонтанная секреция), а также в ответ на пресинаптический потенциал действия и вход ионов Ca^{2+} в нервное окончание через потенциал-зависимые Ca -каналы (вызванная секреция). В вызванной секреции медиатора выделяют два компонента – синхронный, при котором высвобождение квантов медиатора осуществляется в течение нескольких миллисекунд после потенциала действия, и асинхронный, который продолжается десятки и сотни миллисекунд [1–3]. В большинстве синапсов основным компонентом является синхронная секреция медиатора, посредством которой при низкочастотном раздражении может освобождаться более 90% квантов [4, 5]. Однако при увеличении частоты раздражения отмечается рост доли асинхронной секреции

медиатора [6]. Один из экспериментальных подходов к изменению соотношения синхронной и асинхронной секреции – использование растворов, содержащих ионы различных щелочноземельных металлов. Так увеличение доли асинхронной секреции происходит при замене ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} и Ba^{2+} [2, 7, 8]. Считают, что синхронность освобождения квантов медиатора реализуется благодаря нескольким пресинаптическим механизмам, таким, как быстрое кратковременное открытие Ca -каналов в ответ на деполаризацию мембраны, свойства белковой «машины» секреции, запускающей выделение квантов медиатора только при высокой внутриклеточной концентрации кальция, а также малое расстояние между Ca -каналом и Ca -сенсором экзоцитоза [9]. Механизмы асинхронной секреции медиатора остаются недостаточно изученными. Предполагают, что Ca^{2+} -сенсор асинхронной секреции располагается на большем расстоянии от Ca -канала и характеризуется другой динамикой связывания ионов Ca^{2+} [10–13].

В то же время можно предположить, что везикулы, участвующие в синхронной и асинхронной секреции медиатора, различны и могут представлять самостоятельные популяции. Такое предположение не лишено оснований. Во-первых, изучение процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях позволило выделить два функционально различных пула (рециклирующий и резервный). Рециклирующий пул представлен докированными в области активных зон везикулами, он быстро истощается при высокочастотной активности и восполняется за счет мобилизации везикул и быстрого эндоцитоза. Резервный, более крупный, пул везикул участвует в восстановлении рециклирующего пула при высокочастотном раздражении, включается в процесс секреции позднее и восполняется посредством медленного эндоцитоза [14, 15]. Во-вторых, получены данные, позволяющие предположить существование обособленных популяций везикул, обеспечивающих спонтанную [16, 17] и асинхронную секрецию медиатора [18, 19], но не участвующих в вызванной, синхронной секреции. В настоящей работе с использованием электрофизиологического подхода и флуоресцентной конфокальной микроскопии делается попытка оценить идентичность пулов везикул, принимающих участие в синхронной и асинхронной секреции, в двигательном нервном окончании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования, растворы

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы травяных лягушек (*Rana temporaria*) в зимний (декабрь–февраль) период. Работа проведена в соответствии с международными правилами работ с использованием экспериментальных животных. Использовали стандартный раствор Рингера следующего состава (в мМ): 115.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl₂, 2.4 NaHCO₃; pH поддерживали на уровне 7.2–7.4; температура 20°C. Все исследования проводили только на поверхностно расположенных синапсах. Наряду со стандартным раствором (Ca-раствор) использовали растворы, в которых CaCl₂ был заменен на SrCl₂ или BaCl₂ в концентрации 1.8 мМ (Sr-, Ba-растворы). Вызванную секрецию медиатора и экзоцитоза везикул инициировали длительным высокочастотным (20 имп/с) раздражением двигательного нерва прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1–0.2 мс сверхпороговой силы, подаваемыми с помощью стимулятора DS3 (Digitimer Ltd., Великобритания). Сокращения препарата блокировали поперечным рассечением мышечных волокон. Использовали реактивы фирмы Sigma (США).

Электрофизиология

Многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) и одноквантовые асинхронные сигналы регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 2–10 МОм, заполненных 3 М раствором KCl. Микроэлектрод вводили в мышечное волокно в области нервных окончаний под визуальным контролем. Уровень мембранного потенциала покоя контролировали при помощи милливольтметра. Эксперименты, в которых происходило уменьшение мембранного потенциала покоя, не учитывались. Оцифровывание сигналов производили с помощью платы АЦП Ла-2USB. Для регистрации и анализа сигналов применяли оригинальную компьютерную программу Elph (разработчик А.В. Захаров).

Количественная оценка синхронной секреции медиатора

Для количественного расчета квантового состава ПКП использовали модифицированный метод вариаций, детально описанный нами ранее [20]. Для этого рассчитывали площадь каждого ПКП в серии. Далее на графике динамики снижения площади ПКП при высокочастотном раздражении находили участок, в котором средняя площадь ПКП практически не менялась (обычно 10–30 с раздражения). По колебаниям площади ПКП в этом участке можно рассчитать квантовую величину, т.е. среднюю величину площади ПКП, производимую одним квантом медиатора (q):

$$q = \sigma^2 / \langle V \rangle, \quad (1)$$

где σ – дисперсия площади ПКП, $\langle V \rangle$ – средняя площадь ПКП на данном участке.

Далее можно определить квантовый состав каждого ПКП в серии:

$$m_i = V_i / q, \quad (2)$$

где m_i – квантовый состав i-го ПКП, V_i – площадь i-го ПКП.

Количественная оценка асинхронной секреции медиатора в Ca- и Sr-растворах

Асинхронную секрецию медиатора оценивали путем подсчета количества одноквантовых сигналов, возникающих после ПКП, в период между раздражениями (50 мс), рассчитывая их частоту (количество квантов в секунду). Одноквантовые сигналы подсчитывали как автоматически, так и при визуальном просмотре регистраций.

Количественная оценка асинхронной секреции медиатора в Ва-растворах

Раздражение в Ва-растворах вызывает квантовую секрецию большого количества медиатора, приводящую к развитию устойчивой деполяризации концевой пластинки, что подтверждено биохимическими методами [21]. Высокочастотное раздражение в Ва-растворах приводит к появлению огромного количества асинхронно возникающих одноквантовых сигналов, которые накладываются друг на друга и не поддаются подсчету [7, 22]. Поэтому секрецию медиатора (частота одноквантовых асинхронных потенциалов) оценивали по производимому асинхронными сигналами деполяризационному изменению мембранного потенциала с коррекцией на нелинейность их суммации с использованием формулы [22]:

$$n = \frac{V}{1 - V / (E - \varepsilon)} \cdot \frac{1}{a \cdot \tau}, \quad (3)$$

где V – деполяризация постсинаптической мембраны, мВ, E – мембранный потенциал покоя, мВ, a – средняя амплитуда асинхронных одноквантовых сигналов, мВ, τ – временная постоянная асинхронных одноквантовых сигналов, мс, ε – равновесный ацетилхолиновый потенциал (≈ -15 мВ).

Флуоресцентная микроскопия

Процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул изучали с использованием флуоресцентного красителя FM 1-43 (SynaptoGreen C4, фирма Sigma, США) в концентрации 6 мкМ. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза (после стимуляции экзоцитоза) оказывается внутри образующихся синаптических везикул («загружается» в нервные окончания) [23]. Поскольку процессы эндоцитоза продолжаются и некоторое время после окончания экзоцитоза, в наших экспериментах краситель присутствовал в растворе как во время раздражения (20 имп/с), так и в течение 5 мин после его окончания. Далее препарат отмывали в растворе без красителя в течение 20 мин для устранения связанного с поверхностной мембраной красителя. В этом случае в нервном окончании наблюдались ярко светящиеся пятна, отражающие скопления синаптических везикул, содержащих краситель в области активных зон. Стимуляция экзоцитоза предварительно загруженных везикул вызывает освобождение («выгрузку») красителя из нервных окончаний [23]. Флуоресценцию наблюдали с помощью моторизованного микроскопа BX51W1 (Olympus, Германия), оснащенного конфокальным сканирующим диском DSU и CCD-камерой OrcaR2 (Hamamatsu, Япония), совмещенной с персо-

нальным компьютером через специализированный софт Olympus Cell^P. Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала набор светофильтров Olympus U-MNB2 и водно-иммерсионный объектив Olympus LUMPLFL 60xw (1.0 NA). Свечение анализировали в центральном участке нервного окончания протяженностью 20 мкм. Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах (о.е.) свечения пикселя за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50×50 пикселей в участке изображения без нервных окончаний [12, 24, 25]. Профиль свечения в нервной терминали рассчитывали как среднюю интенсивность свечения рядов пикселей, расположенных перпендикулярно продольной оси терминали с шагом в 1 пиксель.

Статистический анализ проводили с использованием программы Origin Pro. Количественные результаты исследования представлены в форме среднее значение \pm стандартная ошибка, n – число независимых опытов. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Стьюдента и ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секреция медиатора при высокочастотном раздражении в Са-, Sr- и Ва-растворах

При высокочастотном раздражении в Са-растворе регистрировались многоквантовые ПКП (синхронная секреция медиатора), сопровождавшиеся редкими одноквантовыми асинхронными сигналами (рис. 1А). Квантовый состав первого многоквантового ПКП в серии составлял 321 ± 120 квантов ($n = 6$). В процессе высокочастотного раздражения наблюдалось снижение квантового состава, который к концу 3-й минуты раздражения составлял $44.3 \pm 9.0\%$ ($n = 6$) от исходного уровня (рис. 1Б). Асинхронная секреция в течение первой секунды высокочастотного раздражения была незначительной (5.9 ± 1.4 кванта s^{-1} , $n = 7$), но к концу 3-й минуты раздражения возрастала до $40.0 \pm 9.7 s^{-1}$ ($n = 7$) (рис. 1Б). После окончания раздражения одноквантовые асинхронные сигналы исчезали в течение 1 с. Произведенные расчеты показали, что за 3 мин раздражения в Са-растворе посредством синхронной секреции высвобождается 880251 ± 275892 квантов ($n = 6$), а асинхронной – 6751 ± 1476 квантов ($n = 7$).

В Sr-растворе при высокочастотном раздражении также регистрировались многоквантовые ПКП, за которыми следовали одноквантовые асинхронные сигналы (рис. 1А). Исходный квантовый состав оказался значительно ниже, чем в Са-растворе – 4.7 ± 0.8 кванта ($n = 4$). К окончанию первой мину-

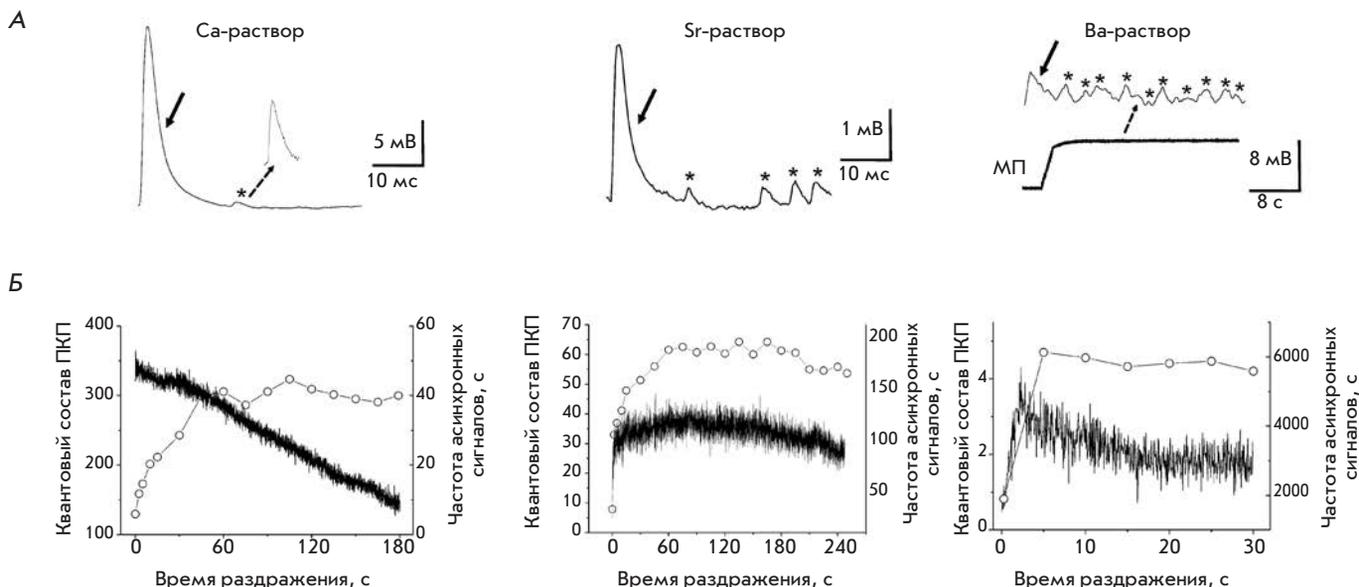


Рис. 1. Синхронная и асинхронная вызванная секреция медиатора при высокочастотном раздражении в Ca-, Sr-, Ba-растворах. А – примеры регистрации потенциалов концевой пластинки (ПКП) и асинхронных одноквантовых сигналов при высокочастотном (20 имп/с) раздражении в Ca-, Sr-, Ba-растворах (1.8 мМ). Стрелками указаны ПКП, звездочками – асинхронные одноквантовые сигналы. Заметно, что в Ba-растворах при раздражении развивается стойкая деполяризация мембраны мышечного волокна (МП). Б – динамика усредненного (по всем экспериментам) квантового состава ПКП (темные линии, оси ординат – слева) и усредненной частоты одноквантовых асинхронных сигналов (светлые кружки, оси ординат – справа) в процессе высокочастотного раздражения

ты раздражения квантовый состав ПКП возрастал до 34.3 ± 9.1 ($n = 4$) и поддерживался на относительно стабильном уровне до окончания стимуляции (рис. 1Б). В Sr-растворе асинхронная секреция оказалась более значимой, чем в Ca-растворе. В первую секунду раздражения частота одноквантовых сигналов составляла 32.6 ± 5.8 , а к концу 3-й минуты – 185.2 ± 10.7 квантов/с ($n = 5$) (рис. 1Б). После окончания раздражения одноквантовые асинхронные сигналы исчезали в течение 1 с. Оказалось, что за 3 мин раздражения в Sr-растворе количество выделенных синхронной и асинхронной секрецией квантов медиатора составляет 126359 ± 29687 ($n = 4$) и 31633 ± 1912 ($n = 5$) соответственно. Возникающая в Ca- и Sr-растворах асинхронная секреция медиатора не приводила к изменению мембранного потенциала покоя.

Высокочастотное раздражение двигательного нерва в Ba-растворе вызывало появление одно-трехквантовых ПКП и огромного количества асинхронных одноквантовых сигналов. Квантовый состав ПКП быстро возрастал к 2–3 с и последовательно снижался к окончанию раздражения до 1.85 ± 0.47 ($n = 7$) (рис. 1Б). Продолжительное раздражение

в течение первых нескольких секунд приводило к деполяризации мышечных волокон с уровня покоя -45 ± 2.9 мВ до -37 ± 3.1 мВ ($n = 7$), сохранявшейся все время раздражения. После окончания раздражения мембранный потенциал в течение 3–7 с возвращался к исходному уровню. Расчет по формуле 3 (см. раздел «Экспериментальная часть») позволил заключить, что такая деполяризация может вызываться асинхронными одноквантовыми сигналами с частотой 6131 ± 455 с⁻¹ ($n = 7$). Дальнейшие расчеты показали, что 30-секундное раздражение в Ba-растворе приводит к освобождению синхронной секрецией 1224 ± 180 квантов ($n = 7$), а асинхронной – 189648 ± 41712 квантов ($n = 7$).

Представленные данные свидетельствуют о том, что при высокочастотном раздражении в Ca-растворах практически все кванты медиатора освобождаются синхронно (примерно 99.2%), а доля асинхронной секреции незначительна. Применение Sr-растворов приводит к уменьшению доли синхронно освобождающихся квантов до 80% и увеличению асинхронно освобождающихся до 20%. В Ba-растворах обнаружено практически только асинхронное выделение квантов (примерно 99.4%).

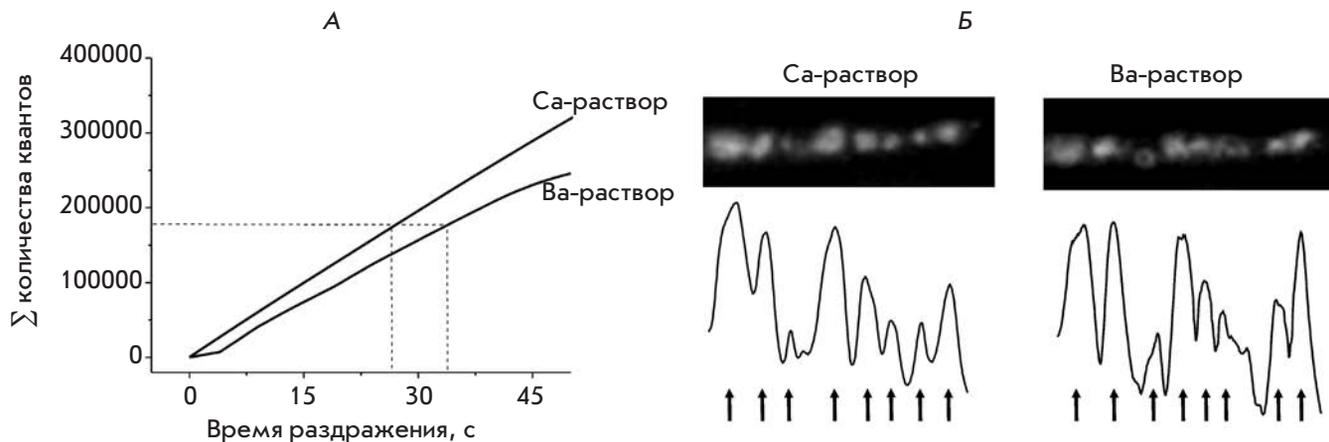


Рис. 2. Эндоцитоз синаптических везикул в Са- и Ва-растворах. А – кумулятивные кривые количества освобожденных синхронных и асинхронных квантов медиатора в Са- и Ва-растворах в процессе высокочастотного раздражения (построены, исходя из данных, представленных на рис. 1Б). Заметно, что 180000 квантов медиатора (штриховая линия) освобождаются при раздражении в Са- и Ва-растворах примерно за 30 с. Б – примеры регистрации флуоресценции одного и того же участка нервного окончания, последовательно загруженного красителем FM 1-43 при высокочастотном раздражении продолжительностью 30 с в Са- и Ва-растворах (подробнее в тексте). Снизу показаны профили свечения нервного окончания. Заметно, что расположение пятен совпадает (указаны стрелками)

В дальнейшем для изучения процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при синхронной и асинхронной секреции медиатора мы применяли Са- и Ва-растворы.

Экзо- и эндоцитоз синаптических везикул при синхронной и асинхронной секреции медиатора

Эффективность эндоцитоза синаптических везикул оценивали по загрузке красителя FM 1-43 при длительном высокочастотном раздражении в Са- и Ва-растворах. Известно, что эффективность захвата красителя FM 1-43 определяется интенсивностью процессов экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора. Поэтому для загрузки красителя в Са- и Ва-растворах необходимо, чтобы за время раздражения освобождалось одинаковое количество квантов медиатора. Анализ кумулятивных кривых (сумма квантов, освободившихся синхронно и асинхронно, рис. 2А) показал, что 180000 квантов медиатора в Са- и Ва-растворах освобождаются примерно за 30 с раздражения. Именно такую продолжительность раздражения использовали для загрузки красителя в наших опытах. В этих условиях в Са- и Ва-растворах наблюдались ярко светящиеся пятна (интенсивность свечения нервных терминалей – 0.114 ± 0.008 ($n = 23$) и 0.119 ± 0.011 о.е. ($n = 20$) соответственно) (рис. 2Б, 3В). Полученные данные свидетельствуют о том, что как при синхронном,

так и асинхронном экзоцитозе везикул идут эффективные процессы рециклизации с образованием новых синаптических везикул посредством эндоцитоза.

Следующие эксперименты были направлены на оценку способности везикул, участвующих в асинхронной секреции медиатора, подвергаться синхронному экзоцитозу.

Для этого нервные окончания предварительно загружали FM 1-43 в Ва- или Са-растворе (стимуляция асинхронного или синхронного экзоцитоза соответственно), а затем сравнивали динамику выгрузки красителя при высокочастотном раздражении в Са-растворе (стимуляция синхронного экзоцитоза). Показано (рис. 3Б), что в этих условиях динамика выгрузки красителя была одинаковой. Через 1 мин раздражения предварительно загруженных нервных окончаний в Ва- и Са-растворах интенсивность свечения снижалась до 80.1 ± 1.2 ($n = 7$) и $76.0 \pm 1.2\%$ ($n = 7$) соответственно, а через 15 мин – до 55.9 ± 2.2 ($n = 7$) и $55.3 \pm 5.4\%$ ($n = 7$) соответственно, а флуоресцирующие пятна исчезали (рис. 2В). Таким образом, синаптические везикулы, участвовавшие в асинхронном экзоцитозе и секреции медиатора, были способны подвергаться синхронному экзоцитозу.

В нескольких экспериментах проводили детальный анализ светящихся пятен в нервных окончаниях одного и того же препарата, возникающих при стимуляции синхронной и асинхронной секреции. Для этого

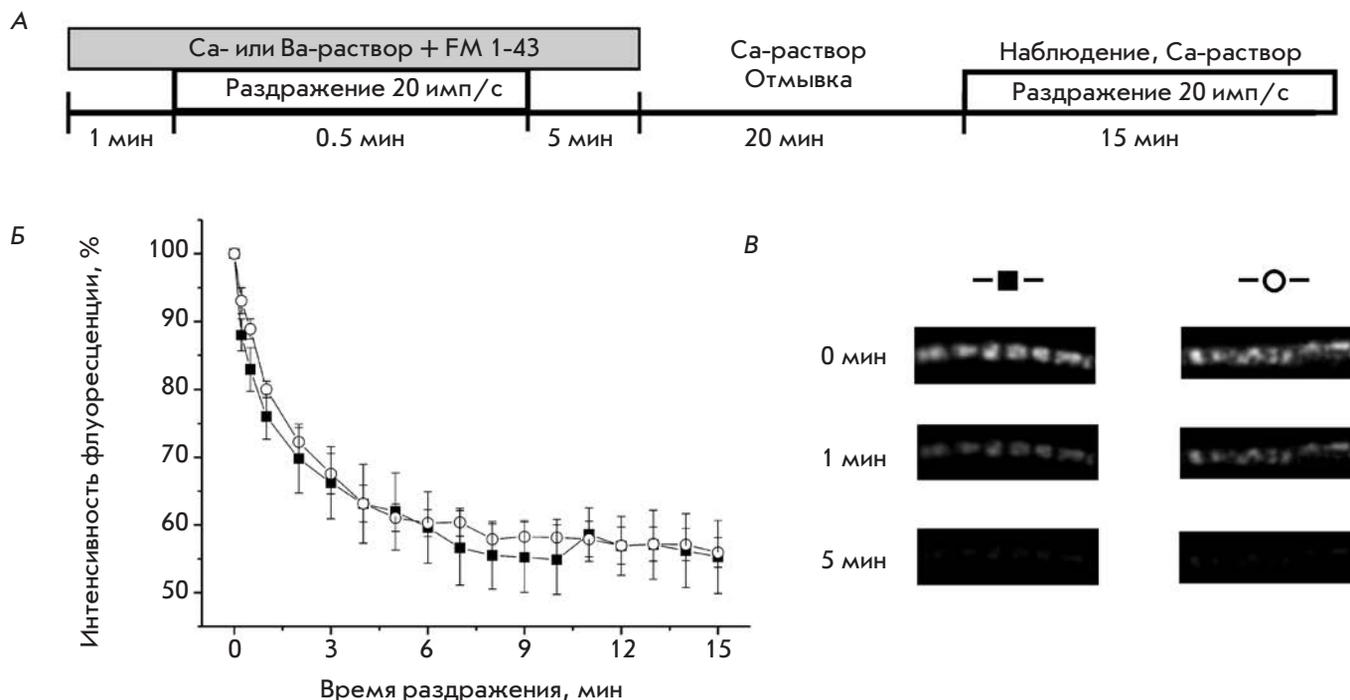


Рис. 3. Экзоцитоз синаптических везикул, загруженных красителем в Ca- и Ba-растворах. **А** – схема эксперимента. Нервные окончания загружались красителем в Ca- или Ba-растворе, а затем выгружались в Ca-растворе. **Б** – динамика спада интенсивности флуоресценции (выгрузка красителя) нервных окончаний, предварительно загруженных в Ca- (черные квадратики) и Ba- (белые кружочки) растворах, в % от первоначальной величины. **В** – примеры регистрации флуоресценции из **Б**

сначала анализировали пятна, возникающие при загрузке красителя в Ca-растворе. Затем краситель выгружали (раздражение в течение 15 мин) и нервные окончания повторно загружали красителем в Ba-растворе с анализом пятен. Пространственный анализ светящихся пятен одного и того же нервного окончания в Ca- и Ba-растворах выявил их идентичность (рис. 2Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что как при синхронном, так и асинхронном экзоцитозе везикул процессы рециклизации происходят в одних и тех же участках нервного окончания, прилегающих к активным зонам.

Оценка участия везикул рециклирующего и резервного пула в асинхронной секреции медиатора

В данной части работы производили изолированную загрузку везикул либо рециклирующего, либо резервного пулов красителем FM 1-43 в Ca-растворе с последующей оценкой способности их участия в асинхронной секреции медиатора. Для загрузки везикул рециклирующего пула использовали кратковременное (12 с) высокочастотное (20 имп/с) раздражение [26]. При этом в нервном окончании

появлялись слабосветящиеся пятна, отражающие скопления везикул рециклирующего пула в области активных зон. В последующем анализировали динамику выгрузки красителя при стимуляции синхронной (Ca-раствор) и асинхронной (Ba-раствор) секреции медиатора. Различий в динамике снижения свечения не выявлено. Так, через 1 мин стимуляции в Ca- и Ba-растворах интенсивность свечения нервных терминалей падала до 74.2 ± 4.3 ($n = 4$) и $72.2 \pm 3.4\%$ ($n = 5$) соответственно, а через 5 мин – до 60.8 ± 4.3 ($n = 4$) и $61.4 \pm 4.3\%$ ($n = 5$) соответственно (рис. 4Б,В).

Для загрузки резервного пула использовали модификацию протокола [26]. Первоначально проводили высокочастотное раздражение препарата в Ca-растворе с FM 1-43 продолжительностью 3 мин. Данный протокол приводит к окрашиванию везикул рециклирующего и резервного пулов. После отмывки препарата снова производили высокочастотное раздражение, но в течение 25 с, что приводило к выбросу красителя везикулами рециклирующего пула. В результате оставшиеся в нервном окончании окрашенные синаптические везикулы принадлежали преимущественно резервному пулу [26].

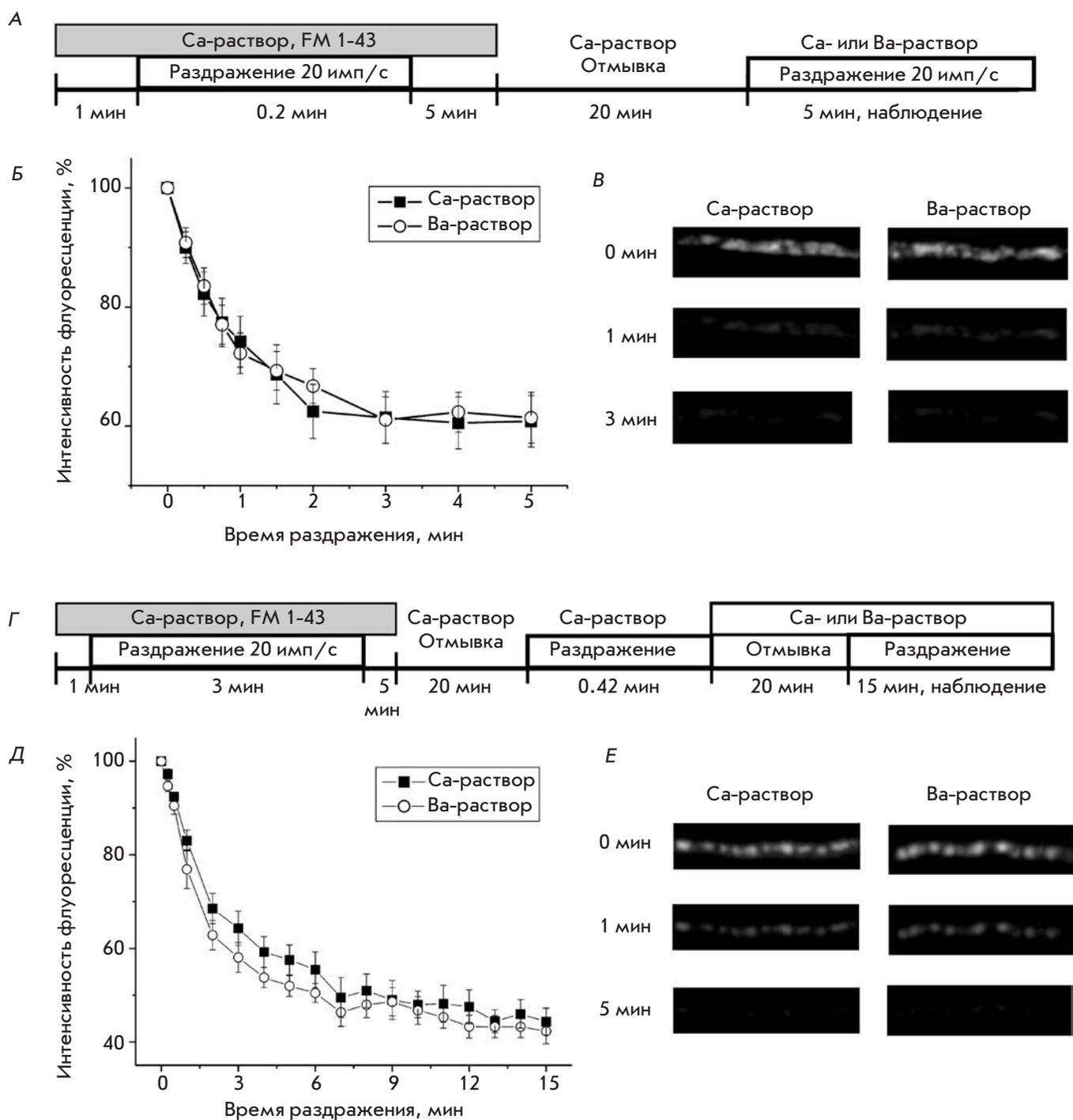


Рис. 4. Экзоцитоз синаптических везикул рециклирующего и резервного пулов в Са- и Ва-растворах. **А** – схема эксперимента по избирательной окраске и изучению экзоцитоза везикул рециклирующего пула. **Б** – динамика спада интенсивности флуоресценции нервных терминалей с предварительно окрашенным рециклирующим пулом при высокочастотном раздражении в Са- (черные квадратики) и Ва-растворах (белые кружочки). **В** – примеры регистрации флуоресценции нервных терминалей из **Б**. **Г** – схема опыта по избирательной окраске и изучению экзоцитоза везикул резервного пула. **Д** – динамика спада интенсивности флуоресценции нервных терминалей с предварительно окрашенным резервным пулом при высокочастотном раздражении в Са- (черные квадратики) и Ва-растворах (белые кружочки). **Е** – примеры регистрации флуоресценции нервных терминалей из **Д**.

Последующее высокочастотное раздражение окрашенных препаратов в Са-растворе (стимуляция синхронной секреции медиатора) и Ва-растворе (стимуляция асинхронной секреции медиатора) приводило к идентичному падению свечения нервных окончаний (рис. 4Д). Через 1 мин стимуляции в Са- и Ва-растворах интенсивность свечения нервных терминалей снижалась до 83.1 ± 2.2 ($n = 7$) и $76.9 \pm 4.1\%$ ($n = 6$) соответственно, а через 15 мин – до 44.3 ± 2.9 ($n = 7$) и $42.3 \pm 2.7\%$ ($n = 6$) соответственно (рис. 4Д,Е). Представленные данные свидетельствуют о том, что везикулы как рециклирующего, так и резервного пулов способны наряду с синхронной секрецией участвовать и в асинхронной секреции медиатора.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно появились экспериментальные данные, указывающие на различия в механизмах синхронной и асинхронной секреции медиатора. Предположили, что запуск обоих видов вызванной секреции медиатора может осуществляться в области различных пресинаптических Са-каналов [9, 19, 27] с использованием различных белковых молекул, обеспечивающих процессы докиривания и слияния синаптических везикул. Наиболее вероятными кандидатами на роль Са-сенсора синхронной секреции являются Са-связывающие белки синаптотагмины 1, 2, 9, а асинхронной секреции – синаптотагмин 7 и Doc2 [9]. В процессах регуляции синхронной секреции принимают участие белки комплексина и синаптобrevин 2, а асинхронной – VAMP4 и синапсин 2 [28–30]. Эти данные поднимают вопрос об идентичности пулов везикул, принимающих участие в синхронной и асинхронной секреции.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что одни и те же синаптические везикулы способны участвовать как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора с одинаковыми процессами рециклизации. На это указывает способность везикул, прошедших цикл экзоцитоз–эндоцитоз, при синхронной секреции медиатора (Са-растворы) вовлекаться в асинхронный экзоцитоз в Ва-растворах (рис. 4). И наоборот, везикулы, которые первоначально участвовали в асинхронной секреции (Ва-растворы), способны в последующем участвовать в синхронной секреции (Са-растворы) (рис. 3Б,В). Эффективный захват красителя при стимуляции секреции в Ва-растворах (рис. 2Б, 3Б) свидетель-

ствует о том, что асинхронный выброс медиатора, так же как и синхронный, осуществляется посредством полного экзоцитоза везикул с последующим образованием новых везикул за счет эндоцитоза. Синхронный и асинхронный экзоцитоз происходит в одних и тех же участках нервного окончания в области активных зон, о чем свидетельствует полная идентичность расположения и конфигурации светящихся пятен при стимуляции секреции в Са- и Ва-растворах (рис. 2Б).

Способность везикул, относящихся к различным функциональным пулам нервного окончания, участвовать в асинхронной секреции медиатора была проверена в опытах с изолированной загрузкой красителем везикул рециклирующего и резервного пулов. Показано, что динамика выгрузки красителя из везикул как рециклирующего, так и резервного пулов при синхронной и асинхронной секреции медиатора абсолютно идентична, а интенсивность свечения снижалась до одинакового уровня (рис. 4Б,Д). Следовательно, оба пула везикул в одинаковой степени принимают участие как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора. Наши исследования не подтвердили предположение некоторых авторов, что в нервном окончании может существовать обособленная популяция везикул, обеспечивающая асинхронную секрецию медиатора [18, 19], но не участвующая в вызванной, синхронной секреции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные позволяют считать, что источником для обоих видов вызванной секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе служат одни и те же синаптические везикулы. Можно предполагать, что синаптическая везикула содержит набор белков, необходимый как для синхронной, так и для асинхронной секреции, а выбор вида вызванной секреции, в котором будет принимать участие синаптическая везикула, определяется динамикой ионов Ca^{2+} около везикулы, а также расположением везикулы по отношению к кальциевому каналу и свойствами Са-сенсоров экзоцитоза. ●

Авторы выражают благодарность А.В. Захарову за помощь в анализе экспериментальных данных.

Работа поддержана РФФИ (грант № 14-04-01232-а) и РНФ (№ 14-15-00847).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katz B., Miledi R. // Proc. R. Soc. Lond. B. 1965. V. 161. P. 483–495.
2. van der Kloot W., Molgó J. // Physiol. Rev. 1994. V. 74. № 4. P. 899–991.

3. Khuzakhmetova V., Samigullin D., Nurullin L., Vyskočil F., Nikolsky E., Bukharaeva E. // Int. J. Dev. Neurosci. 2014. V. 34. P. 9–18.
4. Rahamimoff R., Yaari Y. // J. Physiol. 1973. V. 228. P. 241–257.
5. Atluri P., Regehr W. // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 8214–8227.

6. Зефилов А.Л., Мухамедьяров М.А. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 8. С. 1041–1059.
7. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2009. Т. 95. № 3. С. 262–272.
8. Bukharaeva E.A., Samigullin D., Nikolsky E.E., Magazanik L.G. // *J. Neurochem.* 2007. V. 100. № 4. P. 939–949.
9. Kaeser P.S., Regehr W.G. // *Annu. Rev. Physiol.* 2014. V. 76. P. 333–363.
10. Cummings D.D., Wilcox K.S., Dichter M.A. // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 17. P. 5312–5323.
11. Sun J., Pang Z.P., Qin D., Fahim A.T., Adachi R., Sudhof T.C. // *Nature.* 2007. V. 450. P. 676–682.
12. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 12. С. 608–612.
13. Burgalossi A., Jung S., Meyer G., Jockusch W.J., Jahn O., Taschenberger H., O'Connor V.M., Nishiki T., Takahashi M., Brose N., Rhee J.S. // *Neuron.* 2010. V. 68. № 3. P. 473–487.
14. Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. V. 6. № 1. P. 57–69.
15. Захаров А.В., Петров А.М., Котов Н.В., Зефилов А.Л. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 4. С. 42–50.
16. Ramirez D.M., Kavalali E.T. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 2. P. 275–282.
17. Sara Y., Virmani T., Deák F., Liu X., Kavalali E.T. // *Neuron.* 2005. V. 45. № 4. P. 563–573.
18. Otsu Y., Shahrezaei V., Li B., Raymond L.A., Delaney K.R., Murphy T.H. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 2. P. 420–433.
19. Peters J.H., McDougall S.J., Fawley J.A., Smith S.M., Andreassen M.C. // *Neuron.* 2010. V. 65. № 5. P. 657–669.
20. Зефилов А.Л., Захаров А.В., Мухаметзянов Р.Д., Петров А.М., Ситдикова Г.Ф. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 2. С. 129–141.
21. Silinsky E.M. // *Pharmacol. Rev.* 1985. V. 37. P. 81–131.
22. Silinsky E.M. // *J. Physiol.* 1978. V. 274. P. 157–171.
23. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron.* 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
24. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
25. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // Цитология. 2003. Т. 45. № 12. С. 34–41.
26. Gaffield M.A., Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Neuron.* 2006. V. 51. № 3. P. 317–325.
27. Wen H., Linhoff M.W., Hubbard J.M., Nelson N.R., Stensland D., Dallman J., Mandel G., Brehm P. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 17. P. 7384–7392.
28. Raingo J., Khvotchev M., Liu P., Darios F., Li Y.C., Ramirez D.M., Adachi M., Lemieux P., Toth K., Davletov B., Kavalali E.T. // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. P. 738–745.
29. Sudhof T.C., Rothman J.E. // *Science.* 2009. V. 323. P. 474–477.
30. Medrihan L., Cesca F., Raimondi A., Lignani G., Baldelli P., Benfenati F. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. № 1512. P. 1–13.

УДК 630.945.4:575.113:[616.1/.153.915/.379-008.64]

Геномное исследование коморбидности сердечно-сосудистого континуума

О. А. Макеева^{1,2*}, А. А. Слепцов¹, Е. В. Кулиш¹, О. Л. Барбараш², А. М. Мазур³,
Е. Б. Прохорчук³, Н. Н. Чеканов³, В. А. Степанов¹, В. П. Пузырев^{1,4**}

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

²Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650000, Кемеровская обл., Кемерово, Сосновый бул., 6

³ЗАО «Геноаналитика», 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 77, оф. 102

⁴Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Томск, Московский тракт, 2

*E-mail: oksana.makeeva@medgenetics.ru

**E-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 14.01.2015

РЕФЕРАТ Коморбидность, или сочетание нескольких заболеваний у одного индивида, – явление распространенное и широко исследуемое. Однако генетические основы неслучайного сочетания болезней остаются недостаточно изученными. Современные технологии и методы анализа геномных данных делают возможным определение генетического профиля у больных, «обремененных» множеством болезней (полипатии, конгломераты болезней), и его сравнение с профилем больных отдельными формами патологии. Проведено ассоциативное исследование трех групп больных с различными сочетаниями сердечно-сосудистых заболеваний и контрольной группы. Выборки больных формировались по принципу только одного заболевания – ишемическая болезнь сердца (ИБС), сочетание двух заболеваний – ИБС и артериальная гипертензия (АГ), сочетание нескольких болезней – ИБС, АГ, сахарный диабет типа 2 (СД2) и гиперхолестеринемия (ГХ). Генотипирование проводили на платформе геномного сервиса «Мой ген» (www.i-gene.ru). Представлен анализ ассоциаций более 1400 генетических полиморфных вариантов с изучаемыми фенотипами. С фенотипом «только ИБС» ассоциировано 14 полиморфных вариантов, в том числе, относящихся к генам *APOB*, *CD226*, *NKX2-5*, *TLR2*, *DPP6*, *KLRB1*, *VDR*, *SCARB1*, *NEDD4L*, *SREBF2*, и варианты в межгенных промежутках rs12487066, rs7807268, rs10896449 и rs944289. С фенотипом «ИБС в сочетании с АГ» ассоциировано 13 генетических маркеров, в том числе в генах *BTNL2*, *EGFR*, *CNTNAP2*, *SCARB1*, *HNF1A* и межгенные полиморфные варианты rs801114, rs10499194, rs13207033, rs2398162, rs6501455, rs1160312. С сочетанием нескольких болезней сердечно-сосудистого континуума (ССК) ассоциировано 14 генетических маркеров, в том числе в генах *TAS2R38*, *SEZ6L*, *APOA2*, *KLF7*, *CETP*, *ITGA4*, *RAD54B*, *LDLR* и *MTAP* и варианты в межгенных промежутках rs1333048, rs1333049 и rs6501455. Для фенотипов «только ИБС» и «ИБС в сочетании с АГ» выявлен один общий генетический маркер – rs4765623 гена *SCARB1*; для «ИБС в сочетании с АГ» и сочетанием нескольких заболеваний (синтропией) выявлено два общих генетических маркера – rs663048 гена *SEZ6L* и rs6501455, находящийся в межгенном регионе; между «синтропией» и «только ИБС» не найдено общих генов из числа изученных. В результате классифицирующего анализа принадлежности ассоциированных генов к основным метаболическим путям организма установлено, что гены липидного обмена вовлечены в формирование всех трех вариантов течения болезней ССК, а гены иммунного ответа специфичны для «изолированной» формы ИБС. Показано также, что коморбидность представляет собой дополнительную сложность на пути использования данных ассоциативных генетических исследований в тестах наследственной предрасположенности к заболеваниям, так как генетический профиль сочетанных заболеваний может отличаться от профиля отдельных, не сочетанных форм патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ассоциативные исследования, генетический полиморфизм, коморбидность, многофакторные заболевания, сердечно-сосудистый континуум, синтропия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АГ – артериальная гипертензия; ГХ – гиперхолестеринемия; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ОКС – острый коронарный синдром; СД2 – сахарный диабет типа 2; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ССК – сердечно-сосудистый континуум.

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике давно обозначена проблема множественных сочетанных заболеваний [1, 2]. До 80% бюджета здравоохранения развитых стран расходуется на пациентов с четырьмя и более заболеваниями [3]. Наиболее распространенный термин для обозначения этого феномена – коморбидность [1]. Однако только та часть сочетанных болезней, которая имеет общую генетическую основу и сходный патогенез, относится к синтропиям, болезням «притяжения», «взаимной склонности» («attraction») [4]. Известно множество клинически доказанных синтропных заболеваний: иммунозависимые болезни (аллергические и аутоиммунные) [5, 6]; эндокринные заболевания, в том числе сочетание сахарного диабета (СД2), аутоиммунного тиреоидита и глютеновой энтеропатии [7], некоторые формы психических заболеваний [8]. Среди них – сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), объединяемые понятием сердечно-сосудистого континуума (ССК).

Термин сердечно-сосудистый континуум в начале 1990-х годов предложили Дзау и Браунвальд. Понятие ССК хорошо описывает развитие и прогрессирование заболеваний во времени, однако также отражает и суть взаимоотношений факторов риска (генетических и внешнесредовых), демонстрируя их общность [9–11]. Гипотеза ССК постулирует, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой определенную цепь событий, которая может запускаться многочисленными взаимосвязанными или независимыми факторами риска, прогрессирует в результате включения множественных сигнальных путей и физиологических процессов, что в итоге приводит к терминальной стадии болезни сердца. Сердечно-сосудистые факторы риска включают повышенный уровень холестерина, артериальную гипертензию, сахарный диабет, курение, ожирение и недостаточную физическую активность. В основе континуума ССЗ (континуум клинических фенотипов) лежит патофизиологический континуум, который включает прогрессирующие на молекулярном и клеточном уровне изменения, на клиническом уровне манифестирующие как болезнь. В основе таких процессов лежат окислительный стресс и эндотелиальная дисфункция, которые, в свою очередь, инициируют целый каскад событий, включая нарушения в системе вазоактивных медиаторов, неспецифический воспалительный ответ и ремоделирование сосудов. Все это приводит к поражению органов-мишеней.

Проблема коморбидности (сочетания заболеваний) создает дополнительную сложность при клиническом использовании геномных маркеров для прогнозирования риска заболеваний. Играют ли генетические

варианты, повышающие риск какого-либо одного заболевания, такую же патогенетическую роль и в случае комплексного фенотипа (сочетание нескольких заболеваний) или их вклад меняется? Как при разработке подходов к генетическому тестированию многофакторных заболеваний учитывать явление генетического плейотропизма и разнонаправленное действие некоторых генетических вариантов: в отношении одного заболевания вариант может быть рисковым, в отношении другого – протективным?

В настоящей работе приведены результаты сравнительного анализа генетической компоненты трех клинических фенотипов – одно заболевание, сочетание двух заболеваний и сочетание нескольких ССЗ – с использованием набора маркеров геномного сервиса «Мой ген» (www.i-gene.ru). Главная цель исследования состояла в поиске общих и специфических генетических маркеров и сравнительном анализе генетической компоненты разных сочетаний сердечно-сосудистых заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование вошли три группы больных с разными сочетаниями ССЗ и контрольная выборка практически здоровых индивидов. Больных с различными сочетаниями заболеваний отбирали из одной общей выборки, включающей более 800 случаев госпитализации в специализированный кардиологический стационар по поводу острого коронарного синдрома (ОКС). Все пациенты прошли детальное клинико-лабораторное обследование в отношении как основного диагноза, так и сопутствующей патологии. Первую выборку отбирали по следующим критериям: больные с ИБС (инфаркт миокарда) без какой-либо сопутствующей патологии ($n = 61$). Таким образом, у больных этой группы диагностирована только ИБС, а другие болезни, такие, как АГ, СД2, исключались. Вторая выборка включала пациентов с сочетанием двух заболеваний – ИБС и АГ ($n = 180$), больные с какими-либо другими ССЗ исключались. Третья выборка включала больных с сочетанием ИБС, АГ, СД2 и ГХ ($n = 68$). Выборка с сочетанием нескольких заболеваний обозначена далее как «синтропия ССК». У остальных пациентов ИБС сочеталась с другой патологией, их в данном исследовании не анализировали.

Контрольная группа относительно здоровых индивидов ($n = 131$) была сформирована по критериям отсутствия ССЗ в анамнезе, нормальным показателям артериального давления, нормальным эхокардиологическим параметрам и показателям липидного спектра крови. Индивидов этой группы отбирали по указанным критериям из эпидемиологической выборки, сформированной для изучения факторов риска ИБС.

Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [12]. Генотипирование проводили на микрочипах Illumina Custom Genotyping Microarrays iSelectHD, изготовленных по заказу ЗАО «Геноаналитика» для геномного сервиса «Мой ген». Микрочип включал 4416 генетических вариантов, из которых 2121 представлены однонуклеотидными заменами в 98 генах моногенных заболеваний, и 1913 полиморфных вариантов ядерного и 382 – митохондриального генома.

С целью минимизации технологической погрешности генотипирования, полиморфные варианты и образцы ДНК отбирали в соответствии со следующими критериями:

- 1) доля генотипированных однонуклеотидных вариантов для одного образца должна составлять не менее 98%;
- 2) доля генотипированных образцов по каждому полиморфному варианту должна превышать 98%;
- 3) идентичность генотипов любых двух образцов должна быть меньше 98%;
- 4) соответствие генотипических данных половой принадлежности полу индивида;
- 5) соблюдение равновесия Харди–Вайнберга в объединенной выборке при уровне статистической значимости $P > 10^{-8}$ и в контрольной группе при $P > 0.05$;
- 6) частота редкого аллеля более 5%;
- 7) полиморфные варианты локализованы в аутосомах.

В результате контроля качества генотипирования с последующим исключением однонуклеотидных замен генов моногенных заболеваний и однонуклеотидных вариантов, локализованных в половых хромосомах и митохондриях, для дальнейшего анализа отобрали 407 образцов геномной ДНК и 1400 полиморфных вариантов.

Ассоциации анализировали с использованием программных пакетов GenABEL для статистической среды R версии 2.14.2. Уровень статистической значимости, рассчитанный методом случайных перестановок с репликацией 10000 раз (пермутационный тест), считали равным $P < 0.05$. Сетевой анализ межгенных взаимодействий проводили на платформе Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins [13]. Для аннотации метаболических и сигнальных путей использовали WEB-based Gene Set Analysis Toolkit [14]. Прогностическую эффективность полиморфных вариантов, показавших статистически значимые ассоциации с изучаемыми фенотипами, анализировали стандартными методами расчета AUC (Area Under Curve).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основная задача исследования состояла в определении общих и специфических генов для исследуемых

фенотипов: отдельное заболевание (ИБС), сочетание двух заболеваний (ИБС и АГ) и комплексный фенотип «синтропия», представляющий собой сочетание нескольких сердечно-сосудистых патологических состояний. Для выявления генов, ассоциированных с тем или иным фенотипом (болезнью или сочетанием болезней), сравнивали частоты аллелей и генотипов у больных и в группе контроля (исследование «случай–контроль»), рассчитывали показатель отношения шансов (OR) и оценивали прогностическую значимость генетических маркеров, показавших статистически значимые ассоциации. Все генетические маркеры/гены классифицировали по принадлежности к тому или иному метаболическому пути или классу генов. Для аннотирования сигнальных и метаболических путей использовали сервис WebGestalt (WEB-based GENE SET ANALYSIS TOOLKIT).

В табл. 1–3 приведена номенклатура и основные статистики генетических вариантов, частоты аллелей которых отличались в группах больных и контроле: хромосомная локализация, rs-номер, частота редкого аллеля, расположение по отношению к близлежащим генам, показатель величины отношения шансов OR. В табл. 4 представлены показатели прогностической ценности полиморфных вариантов, ассоциированных с каким-либо фенотипом: болезнью или сочетанием болезней.

Далее рассмотрим результаты, полученные для каждой из изучаемых фенотипических групп.

Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом ИБС

С фенотипом «только ИБС» ассоциировано 14 полиморфных вариантов (см. табл. 1). Среди них два варианта представлены миссенс-заменами: rs1367117 в гене APOB и rs763361 в гене CD226. Один вариант – rs3095870 – расположен вблизи 5'-конца гена NKX2-5. Семь вариантов находятся в интронных областях: rs1898830 в гене TLR2, rs10239794 в DPP6, rs4763655 в KLRB1, rs7975232 в VDR, rs4765623 в SCARB1, rs3865418 в NEDD4L и rs2267439 в SREBF2. Четыре генетических маркера локализованы в межгенных промежутках: rs12487066, rs7807268, rs10896449 и rs944289 (табл. 1). Прогностическая ценность маркеров, ассоциированных с данным фенотипом, варьировала от 0.62 у rs12487066 до 0.57 для rs1367117 (табл. 4).

С целью анализа структуры наследственной компоненты изучаемых фенотипов выделили несколько групп ассоциированных генов в соответствии с основной биологической функцией, выполняемой ими в организме. Так, гены, варианты которых показали ассоциацию с фенотипом «только ИБС», условно можно разделить на три группы: 1) гены, отвечающие

Таблица 1. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с фенотипом «только ИБС»

| Хромосома | Символ гена | Локализация SNP | SNP | Аллель: MAF | Аллель: OR (95% ДИ) | Точный тест Фишера | Генотипы: OR (95% ДИ) | $P\chi^2$ perm. test |
|-----------|---------------|-----------------|------------|-------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| 2p24 | <i>APOB</i> | Миссенс | rs1367117 | A:0.29 | A:1.76 (1.08–2.88) | 0.022 | AA:3.59 (1.25–10.85) | 0.01 |
| 3q13.1 | | | rs12487066 | G:0.23 | A:0.47 (0.28–0.79) | 0.0026 | AA:0.37 (0.18–0.74) | 0.0031 |
| 4q32 | <i>TLR2</i> | Интрон | rs1898830 | G:0.34 | A:0.51 (0.31–0.82) | 0.0038 | AA:0.43 (0.19–0.9) | 0.021 |
| 5q34 | <i>NKX2-5</i> | 5'-конец | rs3095870 | A:0.39 | G:1.83 (1.1–3.12) | 0.017 | GG:2.09 (1.06–4.17) | 0.024 |
| 7q36.1 | | | rs7807268 | C:0.45 | C:1.96 (1.22–3.17) | 0.0045 | CC:2.73 (1.29–5.82) | 0.0065 |
| 7q36.2 | <i>DPP6</i> | Интрон | rs10239794 | A:0.37 | A:1.99 (1.24–3.2) | 0.0029 | AA:3.35 (1.4–8.26) | 0.0041 |
| 11q13 | | | rs10896449 | G:0.46 | A:0.57 (0.35–0.92) | 0.016 | AA:2.36 (1.16–4.8) | 0.011 |
| 12p13 | <i>KLRB1</i> | Интрон | rs4763655 | A:0.34 | G:0.56 (0.35–0.91) | 0.014 | GG:0.45 (0.21–0.94) | 0.031 |
| 12q13.11 | <i>VDR</i> | Интрон | rs7975232 | A:0.54 | A:0.57 (0.35–0.91) | 0.013 | AA:0.32 (0.11–0.8) | 0.009 |
| 12q24.31 | <i>SCARB1</i> | Интрон | rs4765623 | A:0.25 | G:0.57 (0.35–0.95) | 0.025 | GG:0.4 (0.2–0.8) | 0.0068 |
| 14q13.3 | | | rs944289 | G:0.38 | A:0.55 (0.34–0.88) | 0.012 | AA:0.42 (0.18–0.9) | 0.017 |
| 18q22.3 | <i>CD226</i> | Миссенс | rs763361 | A:0.39 | A:1.79 (1.12–2.87) | 0.012 | AA:2.51 (1.11–5.7) | 0.018 |
| 18q21 | <i>NEDD4L</i> | Интрон | rs3865418 | A:0.53 | A:0.56 (0.35–0.91) | 0.013 | AA:0.36 (0.13–0.86) | 0.017 |
| 22q13 | <i>SREBF2</i> | Интрон | rs2267439 | G:0.39 | A:2.25 (1.33–3.92) | 0.0018 | AA:2.32 (1.17–4.67) | 0.01 |

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 MAF – частота минорного (редкого) аллеля; ДИ – доверительный интервал; OR (95% ДИ) – отношение шансов (95% доверительный интервал); $P\chi^2$ – уровень значимости по хи-квадрату для аллелей с одной степенью свободы; $P\chi^2$ permutation test – уровень значимости по хи-квадрату для генотипов с двумя степенями свободы.

щие за метаболизм липидов, 2) гены, связанные с иммунитетом, и 3) специфические для функции сердца гены.

К группе генов, связанных с метаболизмом липидов, относятся *APOB*, *SREBF2* и *SCARB1*. Так продукт гена *APOB* является основным аполипопротеином хиломикрона и липопротеинов низкой плотности. Известно, что полиморфные варианты и некоторые мутации гена *APOB* связаны с ГХ и высоким риском ИБС [15, 16].

Продукт гена *SREBF2* – активатор транскрипции, необходимый для поддержания липидного гомеостаза. В частности, данный ген регулирует ген *LDLR*, который кодирует рецептор ЛПНП, а также влияет на уровень холестерина и синтез жирных кислот [17].

Ген *SCARB1* кодирует рецептор различных лигандов, участвующих в липидном обмене, таких, как фосфолипиды, эфиры холестерина, липопротеины и фосфатидилсерин. Предположительно, продукт данного гена также участвует в фагоцитозе апоптотных клеток посредством своей фосфатидилсеринсвязывающей активности и в процессах поглощения эфиров холестерина ЛПВП [18].

К группе генов, имеющих отношение к регуляции иммунитета, отнесены *TLR2*, *KLRB1*, *CD226* и *VDR*.

Ген *TLR2* взаимодействует с генами *LY96* и *TLR1* и играет важную роль в формировании врожденного иммунного ответа на бактериальные липопроотеины и другие компоненты микробной стенки. Он активируется факторами MYD88 и TRAF6, что приводит к активации цитокинов фактором NF- κ B и воспалительной реакции. Продукт гена может также способствовать апоптозу [19]. Структурные полиморфизмы в этом гене ассоциированы с восприимчивостью к проказе и некоторым инфекционным заболеваниям [20].

Ген *KLRB1* играет роль ингибитора естественных киллерных клеток (клеток цитотоксичности). Он экспрессируется в Т-лимфоцитах периферической крови, преимущественно в Т-клетках с антигенной памятью [21].

Ген *CD226* кодирует рецептор, участвующий в процессах межклеточной адгезии, сигнализации лимфоцитов, цитотоксичности и секреции лимфокинов цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками [22].

Ген *VDR* кодирует ядерный рецептор витамина D3, однако известно, что этот белок функционирует и в качестве рецептора вторичной желчной кислоты – литохолевой кислоты. Рецептор витамина D3 участву-

Таблица 2. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с фенотипом «ИБС в сочетании с АГ»

| Хромосома | Символ гена | Локализация SNP | SNP | Аллель: MAF | Аллель: OR (95% ДИ) | Точный тест Фишера | Генотипы: OR (95% ДИ) | $P\chi^2$ perm. test |
|-------------|----------------|-----------------|------------|-------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| 1q42 | | | rs801114 | C:0.39 | C:0.66 (0.46–0.95) | 0.025 | CC:0.3 (0.12–0.7) | 0.0018 |
| 2q35 | <i>XRCC5</i> | 3'-Конец | rs2440 | A:0.33 | A:1.57 (1.1–2.26) | 0.012 | AA:2.48 (1.12–5.93) | 0.017 |
| 6p21.3 | <i>BTNL2</i> | Миссенс | rs2076530 | G:0.39 | G:1.57 (1.1–2.23) | 0.01 | GG:1.96 (1.02–3.92) | 0.034 |
| 6q23 | | | rs10499194 | A:0.35 | G:1.52 (1.04–2.22) | 0.026 | GG:2.07 (1.25–3.44) | 0.0037 |
| 6q23 | | | rs13207033 | A:0.35 | G:1.49 (1.02–2.18) | 0.033 | GG:2.02 (1.22–3.36) | 0.004 |
| 7p12 | <i>EGFR</i> | Инtron | rs763317 | A:0.42 | G:0.67 (0.47–0.95) | 0.022 | GG:0.5 (0.29–0.88) | 0.011 |
| 7q35 | <i>CNTNAP2</i> | Инtron | rs7794745 | T:0.36 | A:0.69 (0.48–0.98) | 0.032 | AA:0.52 (0.31–0.87) | 0.011 |
| 12q24.31 | <i>SCARB1</i> | Инtron | rs4765623 | A:0.25 | A:0.63 (0.43–0.93) | 0.017 | AA:0.49 (0.3–0.82) | 0.0038 |
| 15q26 | | | rs2398162 | G:0.4 | A:0.68 (0.47–0.97) | 0.033 | AA:0.43 (0.19–0.93) | 0.027 |
| 17cen–q21.3 | <i>HNF1A</i> | Инtron | rs4430796 | G:0.36 | G:1.59 (1.12–2.28) | 0.0077 | GG:2.12 (1.09–4.3) | 0.024 |
| 17q24.3 | | | rs6501455 | G:0.32 | A:1.52 (1.05–2.19) | 0.023 | AA:2.4 (1.08–5.75) | 0.024 |
| 20p11 | | | rs1160312 | G:0.42 | G:1.56 (1.1–2.22) | 0.011 | GG:2.21 (1.16–4.38) | 0.013 |
| 22q12.1 | <i>SEZ6L</i> | Миссенс | rs663048 | A:0.19 | C:0.57 (0.38–0.87) | 0.0082 | CC:0.53 (0.31–0.88) | 0.011 |

Примечание. См. примечание к табл. 1.

ет в минеральном обмене (обмен кальция), хотя может также регулировать целый ряд других метаболических путей, в частности иммунный ответ [23].

К третьей группе относятся гены, принадлежащие к различным метаболическим и сигнальным путям, но вовлеченные в специфические для сердца функции. Два из них связаны с трансмембранным транспортом электролитов и **проводящей системой сердца** (*NEDD4L* и *DPP6*), а третий – ген *NKX2-5* – кодирует специфичный для сердца **фактор транскрипции**.

Ген *NEDD4L* играет важную роль в транспорте натрия в эпителии, регулируя экспрессию натриевых каналов на поверхности эпителиальных клеток. Было показано, что продукт этого гена участвует в формировании мембранного потенциала и передаче импульса по проводящей системе сердца [24]. Дунн с соавт. [25] показали ассоциацию некоторых полиморфных вариантов гена *NEDD4L* с эссенциальной гипертензией. Аллель А полиморфного варианта rs3865418 ассоциирован с высоким диастолическим давлением у китайцев ($OR = 1.31 (1.04–1.67)$, $P = 0.025$) [26]. В настоящем исследовании аллель А и ге-

нотип АА оказывали протективный эффект в отношении ИБС (табл. 2).

Ген *DPP6* кодирует мембранный белок (белок 6, подобный дипептидиламинопептидазе), член семейства S9В сериновых протеаз. Он способен связываться со специфическими потенциал-зависимыми калиевыми каналами, влияя таким образом на их экспрессию, биофизические свойства и активность канала [27]. Дефекты гена *DPP6* приводят к развитию семейной пароксизмальной фибрилляции желудочков типа 2 [28].

Ген *NKX2-5*, экспрессируемый исключительно в сердце, кодирует гомеобоксодержащий фактор транскрипции. Этот фактор непосредственно участвует в формировании и развитии сердца во внутриутробном периоде [29]. Мутации в гене *NKX2-5* вызывают различные пороки сердца – от малых аномалий до тетрады Фалло (MIM:108900,187500).

Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом «ИБС в сочетании с АГ»

С фенотипом «ИБС в сочетании с АГ» ассоциировано 13 генетических маркеров из числа из-

Таблица 3. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с группой «синтропия ССК»

| Хромосома | Символ гена | Локализация | SNP | Аллель: MAF | Аллель: OR (95% ДИ) | Точный тест Фишера | Генотипы: OR (95% ДИ) | $P\chi^2$ perm. test |
|-----------|----------------|---------------------|------------|-------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| 1q21 | <i>APOA2</i> | 5'-Конец | rs5082 | G:0.47 | A:1.83 (1.15–2.93) | 0.0082 | AA:2.42 (1.22–4.82) | 0.007 |
| 2q31.3 | <i>ITGA4</i> | Синонимичная замена | rs1143674 | A:0.39 | A:1.76 (1.12–2.78) | 0.011 | AA:2.84 (1.27–6.47) | 0.0069 |
| 2q32 | <i>KLF7</i> | 5'-Конец | rs7568369 | A:0.28 | C:0.45 (0.28–0.73) | 0.00084 | CC:0.34 (0.16–0.68) | 0.0007 |
| 7q34 | <i>TAS2R38</i> | Миссенс | rs1726866 | G:0.48 | A:1.65 (1.04–2.63) | 0.028 | AA:2.42 (1.22–4.82) | 0.0073 |
| | | Миссенс | rs10246939 | G:0.48 | A:1.65 (1.04–2.63) | 0.028 | AA:2.42 (1.22–4.82) | 0.0073 |
| 8q22.1 | <i>RAD54B</i> | Синонимичная замена | rs2291439 | G:0.42 | G:0.6 (0.37–0.97) | 0.032 | GG:0.25 (0.06–0.77) | 0.011 |
| 9p21 | <i>MTAP</i> | Интрон | rs7023329 | G:0.52 | A:1.95 (1.23–3.11) | 0.0031 | AA:2.38 (1.2–4.76) | 0.0079 |
| 9p21.3 | | | rs1333048 | C:0.45 | A:0.6 (0.38–0.94) | 0.022 | AA:0.37 (0.15–0.87) | 0.018 |
| 9p21.3 | | | rs1333049 | G:0.44 | C:0.61 (0.38–0.95) | 0.028 | CC:0.39 (0.16–0.88) | 0.022 |
| 16q21 | <i>CETP</i> | 5'-Конец | rs183130 | A:0.35 | G:2.04 (1.21–3.51) | 0.006 | GG:2.19 (1.13–4.32) | 0.013 |
| 17q24.3 | | | rs6501455 | G:0.32 | G:2.06 (1.3–3.29) | 0.0015 | GG:3.91 (1.56–10.33) | 0.0016 |
| 19p13.2 | <i>LDLR</i> | Интрон | rs2738446 | G:0.34 | C:0.61 (0.38–0.97) | 0.032 | CC:0.38 (0.18–0.77) | 0.0045 |
| | | Синонимичная замена | rs688 | A:0.34 | G:0.61 (0.38–0.97) | 0.032 | GG:0.38 (0.18–0.77) | 0.0048 |
| 22q12.1 | <i>SEZ6L</i> | Миссенс | rs663048 | A:0.19 | C:0.52 (0.31–0.88) | 0.01 | CC:0.49 (0.25–0.95) | 0.027 |

Примечание. См. примечание к табл. 1.

ученных (табл. 2). Два из них – миссенс-замены (rs2076530 в гене *BTNL2* и rs663048 в гене *SEZ6L*), четыре – варианты в интронах (rs763317 *EGFR*, rs7794745 *CNTNAP2*, rs4765623 *SCARB1*, rs4430796 *HNF1A*), и шесть – в межгенных областях (rs801114, rs10499194, rs13207033, rs2398162, rs6501455 и rs1160312).

Прогностическая ценность генетических маркеров, оцененная по показателю AUC (площадь под ROC-кривой), варьировала от 0.59 до 0.55 (табл. 4).

Интересно, что данный набор генов трудно связать с каким-либо определенным метаболическим путем и классифицировать подобно генам, ассоциированным с фенотипом «только ИБС». Внимания, несомненно, заслуживает тот факт, что несколько генов связаны с **иммунитетом, предрасположенностью к раку и радиочувствительностью**.

Так ген *BTNL2* относится к регуляторам иммунитета: его продукт – бутирофиллино-подобный белок типа 2, принадлежит к семейству рецепторов В7, которые функционируют как молекулы, стимулирую-

щие Т-клетки: влияют на продукцию цитокинов и регулируют пролиферацию Т-клеток. Полиморфные варианты этого гена ассоциированы с повышенным риском развития рака предстательной железы, болезнью Кавасаки, а также с повреждением коронарных артерий при этом заболевании [30]. Показана связь вариантов этого гена с подверженностью к туберкулезу [31]. Варианты в *BTNL2* связаны с развитием коронарного атеросклероза согласно данным полногеномного исследования [32].

К генам, так или иначе ассоциированным с онкогенезом и иммунной системой, относятся *XRCC5*, *EGFR*, *HNF1A* и *SEZ6L*. Ген *XRCC5* кодирует субъединицу белка Ku размером 80 кДа. Гетеродимерный белок Ku – это АТФ-зависимая ДНК-геликаза II, которая участвует в репарации ДНК путем негомологичного соединения концов. Белок Ku участвует в рекомбинации, необходимой для создания разнообразия антигенсвязывающих центров антител у млекопитающих. Кроме того, Ku-белки вовлечены в поддержание длины теломер и сайленсинг прите-

Таблица 4. Прогностическая эффективность полиморфных вариантов, ассоциированных с фенотипами «только ИБС», «ИБС в сочетании с АГ» и «синтропия ССК»

| «Только ИБС» | | «ИБС в сочетании с АГ» | | «Синтропия ССК» | |
|------------------|------|------------------------|------|------------------|------|
| SNP | AUC | SNP | AUC | SNP | AUC |
| rs1367117 | 0.57 | rs801114 | 0.56 | rs5082 | 0.60 |
| rs12487066 | 0.62 | rs2440 | 0.55 | rs1143674 | 0.59 |
| rs1898830 | 0.59 | rs2076530 | 0.55 | rs7568369 | 0.63 |
| rs3095870 | 0.59 | rs10499194 | 0.59 | rs1726866 | 0.60 |
| rs7807268 | 0.60 | rs13207033 | 0.59 | rs10246939 | 0.60 |
| rs10239794 | 0.59 | rs763317 | 0.57 | rs2291439 | 0.57 |
| rs10896449 | 0.60 | rs7794745 | 0.58 | rs7023329 | 0.60 |
| rs4763655 | 0.61 | rs4765623 | 0.59 | rs1333048 | 0.58 |
| rs7975232 | 0.59 | rs2398162 | 0.55 | rs1333049 | 0.58 |
| rs4765623 | 0.61 | rs4430796 | 0.56 | rs183130 | 0.60 |
| rs944289 | 0.59 | rs6501455 | 0.58 | rs6501455 | 0.59 |
| rs763361 | 0.58 | rs1160312 | 0.56 | rs2738446 | 0.60 |
| rs3865418 | 0.59 | rs3843763 | 0.58 | rs688 | 0.60 |
| rs2267439 | 0.60 | rs663048 | 0.58 | rs663048 | 0.59 |

Примечание. AUC – area under curve (область под кривой).

ломерных генов [33]. Известно, что редкий микросателлитный полиморфизм данного гена ассоциирован с онкопатологией и радиочувствительностью.

Белок, кодируемый геном *EGFR*, представляет собой трансмембранный гликопротеин, рецептор эпидермального фактора роста [34]. Дефекты данного гена приводят к нарушению апоптоза, активно изучается связь этого гена с канцерогенезом [35]. Аллель А rs763317, считающийся аллелем риска рака легкого, относится к неблагоприятным в отношении фенотипа «ИБС в сочетании с АГ».

Продукт гена *HNF1A* – активатор транскрипции, регулирующий тканеспецифичную экспрессию некоторых генов, особенно в клетках поджелудочной железы и печени [36]. Дефект гена приводит к семейной форме аденомы печени (MIM:142330), сахарному диабету типа MODY3 (MIM:600496) и к инсулинзависимому сахарному диабету типа 2 (MIM:612520). Нами показано, что аллель G, являющийся фактором риска СД2, неблагоприятен в отношении развития сочетанной патологии ИБС и АГ.

Функция гена *SEZ6L* изучена недостаточно. Предполагается, что он связан со специфическими функциями эндоплазматического ретикулума. Ген экспрессируется в тканях головного мозга и легких и не экспрессируется в клетках рака легкого, поэтому активно изучается [37]. Опубликованы данные

о связи полиморфных вариантов гена *SEZ6L* с ИБС [38], однако механизм такой связи не известен. Нами получены данные о том, что аллель риска развития рака легкого является неблагоприятным фактором и для ИБС в сочетании с АГ.

Нами установлено, что ген *CNTNAP2* ассоциирован с сердечно-сосудистым фенотипом (что необычно, учитывая известные функции этого гена). Ген *CNTNAP2* кодирует трансмембранный белок, входящий в семейство нейрексинов, которые функционируют в нервной системе в качестве молекул клеточной адгезии и рецепторов. Белок *CNTNAP2* осуществляет свои основные функции в миелинизированных аксонах, обеспечивая взаимодействие между нейронами и глией. Он также отвечает за локализацию калиевых каналов и дифференциацию аксонов на отдельные функциональные субдомены. Варианты гена *CNTNAP2* связаны с широким спектром психических заболеваний, включая аутизм, шизофрению, умственную отсталость, дислексию и нарушение языковых функций [39]. Аллель А – рискованный в отношении развития шизофрении, протективный в отношении фенотипа «ИБС в сочетании с АГ».

Ген *SCARB1* связан с липидным обменом как описано нами. Это ген, «общий» для фенотипов «ИБС» и сочетания «ИБС и АГ».

Функции нескольких генетических вариантов, находящихся в межгенных областях, требуют дальнейшего анализа. Ассоциация с заболеванием может объясняться неравновесием по сцеплению с некоторыми другими генами/вариантами, непосредственно влияющими на формирование заболевания или самостоятельным регуляторным значением. Межгенный вариант rs1160312A по данным некоторых исследований связан с облысением, в то же время он протективный в случае ИБС в сочетании с АГ. По данным масштабного исследования консорциума Wellcome Trust, выполненного методом «случай–контроль», аллель А rs2398162 этого гена является фактором риска эссенциальной гипертензии, в нашей работе аллель А – протективный.

Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом «синтропия ССК»

С синтропией ССК ассоциированы 14 маркеров (табл. 3). Из них три представлены миссенс-заменами: rs1726866 и rs10246939 в гене *TAS2R38* и rs66048 в гене *SEZ6L*; три – локализованы вблизи 5'-области генов: rs5082 гена *APOA2*, rs7568369 в 5'-области гена *KLF7* и rs183130 в 5'-области гена *CETP*; три варианта представляли собой синонимичные замены: rs1143674 в гене *ITGA4*, rs2291439 в гене *RAD54B* и rs688 в гене *LDLR*; два варианта находились в интронных областях: rs2738446 в гене *LDLR* и rs7023329 в гене *MTAP*; три маркера располагались в межгенных промежутках: rs1333048 и rs1333049 в области 9p21.3 и rs6501455, локализованный в 17q24.3 между генами *KCNJ2* и *SOX9*, примерно на одинаковом расстоянии (1 млн п. н.).

Гены, ассоциированные с фенотипом «синтропия ССК», можно отнести к одной из следующих групп: а) отвечающие за нарушение липидного метаболизма, б) гены иммунитета и воспаления, в) гены с разными функциями.

Гены *CETP*, *LDLR* и *APOA2* связаны с липидным метаболизмом. Ген *CETP* кодирует переносчик нерастворимых эфиров холестерина. Полиморфные варианты гена *CETP* влияют на уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). В частности, при мутациях данного гена развивается гипер- α -липопротеинемия, сопровождающаяся высоким уровнем ЛПВП (MIM:143470). Аллель G rs183130 ассоциирован с низким уровнем холестерина в составе ЛПВП [40]. Нами показано его участие в формировании фенотипа синтропии ССК.

Ген *LDLR* кодирует белок, функционирующий в качестве посредника эндоцитоза ЛПНП, богатых холестерином [41]. Варианты гена *LDLR* rs2738446 и rs688 находятся в неравновесии по сцеплению. Во Фрамингемском исследовании rs688 ассоциирован

с ИБС, но не связан непосредственно с таким важным эндотипом, как уровень липопротеинов [42]. По некоторым данным rs688 в гене *LDLR* может быть связан с формированием ИБС посредством модуляции активности фактора свертывания VIII [43].

Ген *APOA2* кодирует белковую частицу ЛПВП. Мутации в *APOA2* приводят к семейной ГХ [44]. По некоторым данным генотип AA rs5082 гена *APOA2* ассоциирован с высоким риском развития ИБС у мужчин. В нашей работе генотип AA был ассоциирован с высоким риском развития фенотипа «синтропия ССК».

Гены *ITGA4*, *MTAP* и *CDKN2B* согласно их основным функциям могут быть отнесены к группе генов иммунитета и воспаления. Ген *ITGA4* кодирует белок α -цепи интегрина. Интегрины – важнейшие молекулы межклеточной адгезии. Они представляют собой гетеродимерные мембранные рецепторы, состоящие из α - и β -цепей и функционирующие как клеточно-субстратные и межклеточные рецепторы адгезии. Известно, что повышение адгезии имеет большое значение в дисфункции эндотелия при воспалении, атеросклерозе и других патологических процессах [45, 46]. Данные об ассоциации rs1143674 гена *ITGA4* с сердечно-сосудистыми фенотипами отсутствуют, однако известно, что этот вариант связан с альтернативным сплайсингом. Аллель А rs1143674 ассоциирован с повышенным риском аутизма [47].

Ген *MTAP* расположен в непосредственной близости от *CDKN2A/2B* [48]. Показано, что гены *MTAP* и *CDKN2B* экспрессируются в клетках и тканях, вовлеченных в развитие атеросклероза, таких, как эндотелиоциты, макрофаги и гладкомышечные клетки коронарных артерий [49]. Сообщается, что ген *MTAP* может выступать в качестве супрессора опухолевого роста [50].

Другие четыре гена – *RAD54B*, *SEZ6L*, *TAS2R38* и *KLF7* – это гены с разнообразными функциями. Продукт гена *RAD54B* участвует в репарации ДНК и митотической рекомбинации. Мутации в нем могут быть причиной рака прямой кишки и лимфом [51]. Данных о функциональной роли варианта rs2291439 мало, а сведения об ассоциации этого маркера с заболеваниями сердечно-сосудистой системы отсутствуют.

Ген *TAS2R38* кодирует рецептор, определяющий восприятие чувства горечи [52]. Гаплотипы гена *TAS2R38* определяют до 85% вариативности различий в ощущении оттенков вкуса – от горького до сладкого [53]. Носительство отдельных вариантов *TAS2R38* влияет на пищевые предпочтения, например, пищи с большим количеством углеводов или липидов, что считается фактором риска развития метаболических нарушений и ССЗ. Аллели этого гена,

ассоциированные с фенотипом синтропии, входят в состав гаплотипа, определяющего неспособность ощущать горький вкус; эти же аллели связаны с развитием СД2.

Продукт гена *KLF7* принадлежит к активаторам транскрипции и экспрессируется во многих тканях организма. Изучение модельных животных показало, что *Klf7* специфически регулирует экспрессию гена *TrkA*, кодирующего нейротрофическую рецепторную тирозинкиназу типа 1. Нонсенс-мутация гена *KLF7* приводит к нарушению развития множества ноцицептивных сенсорных рецепторов [54]. Изучение полиморфных вариантов гена *KLF7* выявило ассоциацию с риском развития СД2 в японской популяции и протективный эффект в отношении ожирения в датской популяции [55, 56].

Характеристика гена *SEZ6L* приведена выше, так как этот ген ассоциирован с фенотипом «ИБС и АГ».

Функциональная значимость полиморфизмов, ассоциированных с изучаемым фенотипом и расположенных в межгенных регионах, остается неизвестной. По данным [57], rs6501455 ассоциирован с раком предстательной железы, однако этот аллель протективный для синтропии ССК. Этот ген располагается на хромосоме 17 на расстоянии около 1 млн п. н. от генов *SOX9* и *CALM2P1*, причем в этом же регионе обнаружено еще около 40000 однонуклеотидных полиморфизмов. Важно, что почти все представленные в базе данных PubMed полиморфизмы в этом геномном регионе имели отношение к тому или иному ССЗ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Задача исследования заключалась в идентификации общих и специфических генов для трех фенотипов – отдельное заболевание, сочетание двух болезней и сочетание нескольких ССЗ. На рис. 1 приведены данные о количестве генов, общих и специфических для трех фенотипов. Так, в случае синтропии (сочетание нескольких заболеваний – в нашем случае ИБС, АГ, СД2 и ГХ) и сочетания двух заболеваний (ИБС и АГ) выявлены **два общих гена**; между фенотипами «ИБС и АГ» и изолированной «ИБС» – **один общий ген**, а между синтропией и ИБС **нет общих генов** из числа изученных. Выявлено 14 специфических генетических вариантов, характерных только для ИБС, 12 – для синтропии ССК, 10 – для сочетания ИБС и АГ.

В случае сочетающихся заболеваний важно знать не только долю общих и специфических генов, но и профиль ассоциированных вариантов (физиологическую роль, выполняемую в организме), так как профиль может указывать на наиболее

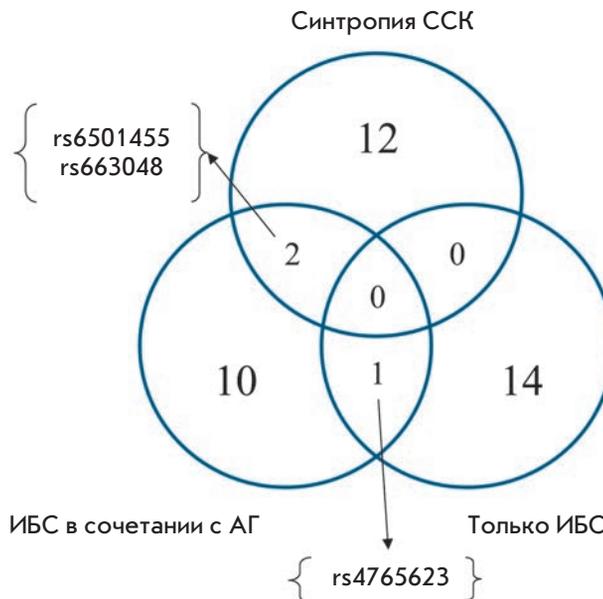


Рис. 1. Венн-диаграмма ассоциированных генетических маркеров с изучаемыми фенотипами: общие и специфические варианты

важные метаболические пути, вовлеченные в формирование патологии и подходы к лечению. Как следует из представленного ассоциативного профиля по каждому изучаемому фенотипу, для ИБС, не сочетающейся с другими ССЗ, характерны гены, регулирующие метаболизм липидов, гены, связанные с иммунитетом, и специфические для функции сердца гены, такие, как гены, контролирующие проводящую систему сердца.

При рассмотрении профиля сочетания двух заболеваний, одно из которых ИБС, картина значительно отличается, и варианты генов, ассоциированные с данным фенотипом, кажутся скорее неожиданными: набор генов трудно связать с каким-либо метаболическим путем и классифицировать подобно генам, ассоциированным с «только ИБС». Отмечено, что с фенотипом сочетания двух болезней связано несколько генов иммунитета и предрасположенности к раку.

Генетический профиль синтропии ССК в целом выглядит закономерным – это гены, отвечающие за нарушение липидного метаболизма, гены, контролирующие иммунитет и реакцию воспаления (и гены с разными функциями).

Необходимо отметить, что выполненный нами анализ обширной панели маркеров (1400), связанных, согласно опубликованным данным, с широко распространенными заболеваниями, позволил выявить неизвестные ранее взаимосвязи, как это часто бывает

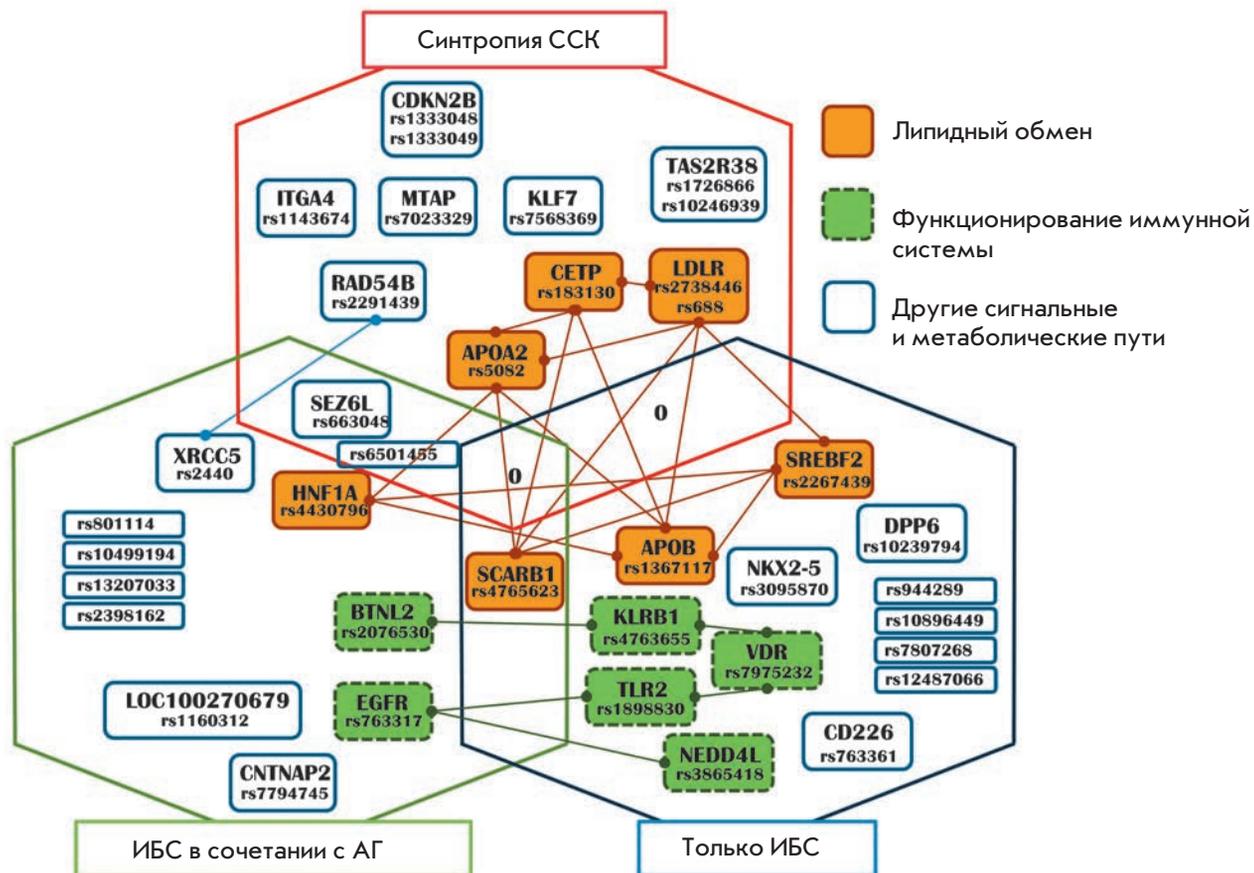


Рис. 2. Венн-диаграмма взаимоотношений всех ассоциированных с изучаемыми фенотипами генов и полиморфных вариантов с учетом их принадлежности к функциональному классу. Межгенные взаимосвязи разработаны на основе данных онлайн сервиса Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)

при широкогеномных исследованиях, например, ассоциацию генов рака, неврологических и психических заболеваний с сердечно-сосудистыми фенотипами.

Описательный анализ функций ассоциированных генов дополнен классифицирующим сетевым анализом межгенных взаимодействий, который позволяет проследить цепочки взаимодействий некоторого списка генов – STRING-анализ (рис. 2). Данный анализ позволяет формально отнести тот или иной ген к наиболее важным метаболическим путям. Такой формализованный анализ показал, что среди генов ИБС преобладают гены, связанные с функцией иммунной системы, и гены липидного обмена. В случае фенотипа ИБС в сочетании с АГ два гена относятся к иммунной системе и два к липидному метаболизму. Именно ген липидного метаболизма *SCARB1* является общим для этих двух форм патологии. Среди генов, ассоциированных с синтропией ССК, три гена были классифицированы как имеющие отношение

к метаболизму липидов. Остальные гены в рамках анализа STRING не были отнесены к какому-либо метаболическому пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что гены липидного обмена вовлечены в формирование всех вариантов течения (в том числе различных сочетаний) болезней сердечно-сосудистого континуума, тогда как гены-регуляторы иммунной системы специфичны для ИБС и не участвуют в формировании синтропии ССК.

Возвращаясь к рассуждению о роли синтропии (неслучайное сочетание заболеваний) и распространенного явления коморбидности, можно сказать, что нами установлена дополнительная сложность в использовании данных ассоциативных генетических исследований в прикладных (диагностических) аспектах тестирования предрасположенности к распространенным заболеваниям. Генетический

профиль сочетания нескольких заболеваний может значительно отличаться от профиля изолированных форм. Выявление синтропных генов (влияющих на развитие сложного фенотипа синтропии) представляет интерес не только с диагностических позиций, но и, в первую очередь, для прогнозирования (или объяснения уже существующих фактов) эф-

фекта некоторых лекарственных препаратов в случае нескольких заболеваний. ●

*Работа поддержана ЗАО «Геноаналитика»,
РФФИ (грант № 13-04-02162) и грантом
Президента РФ для ведущих научных школ
(НШ-5096.2014.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feinstein A.R. // *J. Chronic Disease*. 1970. V. 23. № 7. P. 455–468.
2. Valderas J.M. // *J. Comorbidity*. 2013. V. 3. № 2. P. 41–44.
3. Valderas J.M., Starfield B., Sibbald B., Salisbury C., Roland M. // *Ann. Fam. Med*. 2009. № 7. P. 357–363.
4. Puzyrev V.P., Makeeva O.A., Freidin M.B. // *Pers. Med*. 2010. V. 7. P. 399–405.
5. Cookson W. // *Nat. Rev. Immunol*. 2004. V. 4. P. 978–988.
6. Zhernakova A., van Diemen C.C., Wiyemenda C. // *Nat. Rev. Genet*. 2009. V. 10. № 1. P. 43–55.
7. Doolan A., Donaghue K., Fairchild J., Wong M., Williams A.J. // *Diabetes Care*. 2005. V. 28. P. 806–809.
8. Harvey M., Belleau P., Barden N. // *Trends Genet*. 2007. V. 23. P. 547–556.
9. Dzau V., Braunwald E. // *Am. Heart J*. 1991. V. 121. P. 1244–1262.
10. Dzau V.J., Antman E.M., Black H.R., Hayes D.L., Manson J.E., Plutzky J., Popma J.J., Stevenson W. // *Circulation*. 2006. V. 114. P. 2850–2870.
11. Пузырев В.П., Макеева О.А., Голубенко М.В. // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 3. С. 479–491.
12. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
13. <http://string-db.org/>
14. <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>
15. Pullinger C.R., Hennessy L.K., Chatterton J.E., Liu W., Love J.A., Mendel C.M., Frost P.H., Malloy M.J., Schumaker V.N., Kane J.P. // *J. Clin. Invest*. 1995. V. 95. P. 1225–1234.
16. Soria L., Ludwig E., Clarke H., Vega G., Grundy S., McCarthy B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 587–591.
17. Irisawa M., Inoue J., Ozawa N., Mori K., Sato R. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. № 42. P. 28995–29004.
18. Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A. // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 19. P. 5017–5025.
19. Yang R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.I., Gurney A.L., Godowski P.J. // *Nature*. 1998. V. 395. № 6699. P. 284–288.
20. Bochud P.Y., Magaret A.S., Koelle D.M., Aderem A., Wald A. // *J. Infect. Dis*. 2007. V. 196. № 4. P. 505–509.
21. Lanier L.L., Chang C., Phillips J.H. // *J. Immunol*. 1994. V. 153. № 6. P. 2417–2428.
22. Shibuya A., Campbell D., Hannum C., Yssel H., Franz-Bacon K., McClanahan T., Kitamura T., Nicholl J., Sutherland G.R., Lanier L.L., et al. // *Immunity*. 1996. V. 4. № 6. P. 573–581.
23. Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D. // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 1. P. 173–179.
24. van Bemmelen M.X., Rougier J.S., Gavillet B., Apothéoz F., Daidié D., Tateyama M., Rivolta I., Thomas M.A., Kass R.S., Staub O., et al. // *Circ. Res*. 2004. V. 95. № 3. P. 284–291.
25. Dunn D.M., Ishigami T., Pankow J., von Niederhausern A., Alder J., Hunt S.C., Leppert M.F., Lalouel J.M., Weiss R.B. // *J. Hum. Genet*. 2002. V. 47. № 12. P. 665–676.
26. Wen H., Lin R., Jiao Y., Wang F., Wang S., Lu D., Qian J., Jin L., Wang X. // *Clin. Exp. Hypertens*. 2008. V. 30. № 2. P. 87–94.
27. Strop P., Bankovich A.J., Hansen K.C., Garcia K.C., Brunger A.T. // *J. Mol. Biol*. 2004. V. 343. № 4. P. 1055–1065.
28. Alders M., Koopmann T.T., Christiaans I., Postema P.G., Beekman L., Tanck M.W., Zeppenfeld K., Loh P., Koch K.T., Demolombe S., et al. // *Am. J. Hum. Genet*. 2009. V. 84. № 4. P. 468–476.
29. Turbay D., Wechsler S.B., Blanchard K.M., Izumo S. // *Mol. Med*. 1996. V. 2. № 1. P. 86–96.
30. Hsueh K.C., Lin Y.J., Chang J.S., Wan L., Tsai F.J. // *Eur. J. Pediatr*. 2010. V. 169. № 6. P. 713–719.
31. Lian Y., Yue J., Han M., Liu J., Liu L. // *Infect. Genet. Evol*. 2010. V. 10. № 4. P. 517–521.
32. Lu X., Wang L., Chen S., He L., Yang X., Shi Y., Cheng J., Zhang L., Gu C.C. Huang J., et al. // *Nat. Genet*. 2012. V. 44. № 8. P. 890–894.
33. Boulton S.J., Jackson S.P. // *EMBO J*. 2008. V. 17. № 6. P. 1819–1828.
34. Galisteo M.L., Dikic I., Batzer A.G., Langdon W.Y., Schlessinger J. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 35. P. 20242–20245.
35. Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y., et al. // *Cell*. 2007. V. 14. № 131 (6). P. 1190–1203.
36. Chi Y.I., Frantz J.D., Oh B.C., Hansen L., Dhe-Paganon S., Shoelson S.E. // *Mol. Cell*. 2002. V. 10. № 5. P. 1129–1137.
37. Suzuki H., Gabrielson E., Chen W., Anbazhagan R., van Engeland M., Weijnenberg M.P., Herman J.G., Baylin S.B. // *Nat. Genet*. 2002. V. 31. № 2. P. 141–149.
38. Bressler J., Folsom A.R., Couper D.J., Volcik K.A., Boerwinkle E. // *Am. J. Epidemiol*. 2010. V. 171. № 1. P. 14–23.
39. Rodenas-Cuadrado P., Ho J., Vernes S.C. // *Eur. J. Hum. Genet*. 2014. V. 22. P. 171–178.
40. Spirin V., Schmidt S., Pertsemliadis A., Cooper R.S., Cohen J.C., Sunyaev S.R. // *Am. J. Hum. Genet*. 2007. V. 81. № 6. P. 1298–1303.
41. Francke U., Brown M.S., Goldstein J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 9. P. 2826–2830.
42. Zhu H., Tucker H.M., Grear K.E., Simpson J.F., Manning A.K., Cupples L.A., Estus S. // *Hum. Mol. Genet*. 2007. V. 16. № 14. P. 1765–1772.
43. Martinelli N., Girelli D., Lunghi B., Pinotti M., Marchetti G., Malerba G., Pignatti P.F., Corrocher R., Olivieri O., Bernardi F. // *Blood*. 2010. V. 116. № 25. P. 5688–5697.
44. Takada D., Emi M., Ezura Y., Nobe Y., Kawamura K., Iino Y., Katayama Y., Xin Y., Wu L.L., Larringa-Shum S., et al. // *J. Hum. Genet*. 2002. V. 47. P. 656–664.
45. Vassiliadis E., Barascuk N., Didangelos A., Karsdal M.A. // *Biomark. Insights*. 2012. № 7. P. 45–57.
46. Brachtl G., Sahakyan K., Denk U., Girbl T., Alinger B., Hofbauer S.W., Neureiter D., Hofbauer J.P., Egle A., Greil R., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 8. e23758.
47. Conroy J., Cochrane L., Anney R.J., Sutcliffe J.S., Carthy P,

- Dunlop A., Mullarkey M., O'hici B., Green A.J., Ennis S., et al. // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2009. V. 150B. № 4. P. 535–544.
48. Pasmant E., Laurendeau I., Heron D., Vidaud M., Vidaud D., Bieche I. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 3963–3969.
49. Broadbent H.M., Peden J.F., Lorkowski S., Goel A., Ongen H., Green F., Clarke R., Collins R., Franzosi M.G., Tognoni G., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. P. 806–814.
50. Behrmann I., Wallner S., Komyod W., Heinrich P.C., Schuierer M., Buettner R., Bosserhoff A.K. // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 163. P. 683–690.
51. Miyagawa K., Tsuruga T., Kinomura A., Usui K., Katsura M., Tashiro S., Mishima H., Tanaka K. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 1–2. P. 175–180.
52. Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S., Ryba N.J. // *Cell.* 2003. V. 112. № 3. P. 293–301.
53. Kim U.K., Jorgenson E., Coon H., Leppert M., Risch N., Drayna D. // *Science.* 2003. V. 299(5610). P. 1221–1225.
54. Lei L., Laub F., Lush M., Romero M., Zhou J., Luikart B., Klesse L., Ramirez F., Parada L.F. // *Genes. Dev.* 2005. V. 19. № 11. P. 1354–1364.
55. Kanazawa A., Kawamura Y., Sekine A., Iida A., Tsunoda T., Kashiwagi A., Tanaka Y., Babazono T., Matsuda M., Kawai K., et al. // *Diabetologia.* 2005. V. 48. № 7. P. 1315–1322.
56. Zobel D.P., Andreasen C.H., Burgdorf K.S., Andersson E.A., Sandbaek A., Lauritzen T., Borch-Johnsen K., Jorgensen T., Maeda S., Nakamura Y., et al. // *Eur. J. Endocrinol.* 2009. V. 160. № 4. P. 603–609.
57. Gudmundsson J., Sulem P., Steinthorsdottir V., Bergthorsson J.T., Thorleifsson G., Manolescu A., Rafnar T., Gudbjartsson D., Agnarsson B.A., Baker A., et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 8. P. 977–983.

УДК 577.21

Регуляция репликации аденовирусов человека с помощью РНК-интерференции

Н. А. Никитенко¹, Т. Speiseder², Е. Lam², П. М. Рубцов¹, Х. Д. Тонаева³, С. А. Борзенко³, Т. Dobner², В. С. Прасолов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32, Россия

²Heinrich Pette Institute – Leibniz Institute for Experimental Virology, Martinistrasse 52 D-20251, Hamburg, Germany

³МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава РФ, 127486, Москва, Бескудниковский бул., 59а, Россия

*E-mail: prassolov45@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2015

РЕФЕРАТ Аденовирусы являются причиной большого числа инфекционных заболеваний человека. Офтальмологические инфекции – аденовирусный конъюнктивит и эпидемический кератоконъюнктивит – вызывают, в основном, аденовирусы человека, относящиеся к группе D. Недостаточная эффективность современных методов лечения аденовирусной инфекции обуславливает необходимость поиска и разработки лекарственных средств, избирательно воздействующих на возбудителей данного заболевания. Потенциальными мишенями для создания терапевтических препаратов служат ранние гены аденовирусов человека, такие, как ген ДНК-полимеразы *E2B* и ген *E1A*, играющие важную роль в репликации вирусной ДНК. В настоящей работе предложен подход к эффективному подавлению репликации аденовирусов группы D человека с помощью РНК-интерференции. Созданы модельные линии клеток, которые позволяют быстро определять эффективность действия интерферирующих РНК, комплементарных различным участкам мРНК гена *E1A*. Нами показано значительное подавление экспрессии *E1A* с помощью интерференции РНК в таких клетках. Также показана высокая эффективность малых шпилечных РНК, специфичных в отношении ранних генов *E1A* и *E2B* аденовирусов группы D человека, при подавлении репликации аденовирусов типа D8 и D37 в первичных клетках лимба роговицы глаза человека. Мы надеемся, что результаты нашего исследования смогут послужить основой для разработки современных лекарственных средств для борьбы с заболеваниями человека, вызываемыми аденовирусами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА РНК-интерференция, аденовирусы человека, малые интерферирующие РНК, лентивирусные векторы, малые шпилечные РНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ siРНК – малая интерферирующая РНК; shРНК – малая шпилечная РНК; HAdV – аденовирус человека.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема аденовирусных заболеваний глаз относится к числу наиболее актуальных в современной биомедицине в связи с широким распространением и высокой частотой вспышек аденовирусной инфекции. Аденовирусы вызывают инфекционные заболевания дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта человека. К аденовирусной офтальмологической инфекции относятся такие заболевания, как аденовирусный конъюнктивит – воспаление оболочки глаза, и эпидемический кератоконъюнктивит – сочетанное воспаление конъюнктивы и роговицы [1]. В России ежегодно эпидемический кератоконъюнктивит вы-

являют более чем у 300000 человек [2]. Наиболее тяжелые поражения глаз вызывают аденовирусы человека (HAdV), относящиеся к группе D (типы D8, D19, D36 и D37) [3]. HAdV-инфекциям подвержены все возрастные группы [4]. В России по поводу воспалительных заболеваний глаз к офтальмологу обращается примерно 18 млн человек в год, что составляет до 80% случаев временной нетрудоспособности по причине офтальмологических заболеваний и 10–30% случаев снижения остроты зрения и слепоты [5]. Эпидемический характер распространения, большие потери по временной нетрудоспособности, высокая вероятность развития осложнений – вре-

менной или стойкой утраты зрения, многообразии клинических проявлений определяют медико-социальную значимость аденовирусных заболеваний глаз. Аденовирусные инфекции представляют опасность для людей с заболеваниями иммунной системы [6]. Известно, что к развитию ожирения у детей, а также неалкогольной жировой болезни печени у взрослых приводит заражение аденовирусом типа 36 группы D человека (HAdV D36) [7].

Недостаточная эффективность современных методов лечения аденовирусной инфекции [8] обуславливает необходимость поиска и разработки лекарственных средств, избирательно воздействующих на возбудителей данного заболевания.

Потенциальными мишенями для терапевтических препаратов могут быть ранние гены аденовирусов человека, такие, как ген ДНК-полимеразы *E2B* и ген *E1A*, участвующие в репликации вирусной ДНК [9–11].

Продукты гена *E1A* стимулируют переход клеток из фазы G_0 в фазу *S* клеточного цикла. Взаимодействие продуктов гена *E1A* с белком ретинобластомы (pRb) приводит к активации фактора транскрипции E2F1, запускающего экспрессию генов, необходимых для прохождения *S*-фазы клеточного цикла. Это позволяет аденовирусу эффективно использовать аппарат репликации ДНК инфицированной клетки для репликации собственного генома. Одна из функций фактора транскрипции E2F1 – трансаktivация белка p14/ARF, сопровождаемая индукцией p53-зависимого апоптоза. В ходе вирусной инфекции белок E1B 55 кДа инактивирует p53, не давая ему запустить апоптоз в клетке до завершения цикла репликации аденовируса [12, 13].

Использование малых интерферирующих РНК (siРНК) – коротких дуплексов длиной 21–23 п.н. с выступающими 2–3 нуклеотидами на 3'-концах, способных подавлять экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, позволяет изучать функциональную активность генов [14, 15]. Показана возможность использования интерферирующих РНК для подавления экспрессии различных генов-мишеней, в том числе вирусных генов [16–18]. Для доставки интерферирующих РНК в клетки используются рекомбинантные лентивирусные векторы, кодирующие малые шпилечные РНК (shРНК) – предшественники малых интерферирующих РНК [19–21].

Мы считаем, что этот подход можно применить для подавления экспрессии ранних генов *E1A* и *E2B* [10, 11] HAdV, которые вызывают поражения глаз и дыхательных путей.

В представленной работе приведены результаты ингибирования экспрессии гена *E1A* аденовирусов типов D8, D19, D36 и D37 группы D человека при по-

мощи siРНК и shРНК, а также репликации HAdV D8 и D37 при сочетанном подавлении экспрессии *E1A* и *E2B* с использованием shРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток

В работе использовали перевиваемые клетки эмбриона почки человека HEK293 [22], перевиваемые клетки аденокарциномы легкого человека A549 (DSMZ ACC107; Braunschweig, Germany), перевиваемые клетки немелкоклеточного рака легкого человека H1299 [23], а также первичные клетки лимба человека (Limb) [24, 25]. Клетки линий HEK293, A549 и H1299, а также клетки модельных линий A549 *E1A* и H1299 *E1A* выращивали на среде DMEM (Life Technologies, Великобритания), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Первичные клетки лимба человека культивировали на среде DMEM/F12 (Life Technologies), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ NEPES, 0.4 мкМ инсулина, 10 нМ дексаметазона, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Лентивирусные векторы

Рекомбинантные лентивирусные векторы были сконструированы с помощью стандартных методов генной инженерии [26, 27]. Для получения лентивирусных вирионов ДНК рекомбинантных векторов котрансфицировали в клетки линии HEK293 методом Са-фосфатной трансфекции совместно с плазмидами, направляющими синтез всех лентивирусных белков, необходимых для создания инфекционных лентивирусных частиц. Сбор инфекционных псевдолентивирусных частиц проводили в течение 2 дней с интервалом 12 ч. Титрование проводили на клетках линий A549 и H1299. Вирусные стоки с титрами 5×10^5 – 5×10^6 использовали для проведения дальнейших исследований.

Модельные линии клеток

Модельные клетки, в которых экспрессируется ген *E1A* аденовируса типа 36 человека (*E1A-D36*), получены с помощью трансдукции клеток линий A549 и H1299 псевдолентивирусными частицами *E1A-LeGO-iGT* на основе *LeGO-iGT-Puro-opt*, несущими экспрессирующую кассету «промотор – ген *E1A* аде-

новируса типа 36 человека – IRES – маркерный ген *dTomato* – ген устойчивости к пуromицину.

Для получения клеток модельной линии H1299 shE1A клетки исходной линии H1299 трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими последовательность, кодирующую shE1A, маркерный ген *Cerulean* и ген устойчивости к антибиотику бластицидину (BSD). Через 48 ч после трансдукции клетки помещали в селективную среду с антибиотиком бластицидином (5 мкг/мл). Селекцию продолжали в течение 10 дней. Затем клетки H1299 shE1A анализировали на проточном цитофлуориметре.

Модельные линии Limb shE2B, Limb shE1A и Limb shE2B/shE1A получали, трансдуцируя первичные клетки лимба человека псевдолентивирусными частицами, кодирующими shE2B [10, 11] или shE1A.

siРНК

Для подавления экспрессии гена *E1A* HAdV 8, 19, 36 и 37 в компании «СИНТОЛ» (Россия) были синтезированы siРНК, направленные против разных районов мРНК целевого гена. Были синтезированы siРНК длиной 21 п.н.: siE1A-1 (смысловая цепь 5'-GGAGGACUUUGUGAAUACAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UGUAUUCACAAAGUCCUCCUU-3'); siE1A-2 (смысловая цепь 5'-GAG-GCUGUGAAUUUAAUAUUU-3', антисмысловая цепь 5'-AUUUAAAUUCACAGCCUCUU-3') и siE1A-3 (смысловая цепь 5'-GCUCU-GUGUUACAUGAAAUUU-3', антисмысловая цепь 5'-AUUUCAUGUAACACAGAGCUU-3'). Эти siРНК гомологичны последовательностям гена *E1A* HAdV типов D8, D19, D36 и D37. В качестве контроля использовали siScr, не имеющие гомологии с известными вирусными мРНК, а также мРНК человека, мыши и крысы (смысловая цепь 5'-CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3', антисмысловая цепь 5'-CCACUACAUCGAGACUUGUU-3'). siРНК конструировали с помощью программы Whitehead Institute siRNA Selection Program [28].

Трансфекция siРНК

Клетки в фазе экспоненциального роста высевали на 24-луночные планшеты по 3×10^4 клеток/лунку за 1 сутки до эксперимента и трансфицировали siРНК в концентрации 200 нМ с помощью Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя.

shРНК

Нами были сконструированы лентивирусные векторы shE1A-LeGO-Cer/BSD и shScr-LeGO-Cer/BSD, кодирующие shРНК: shE1A, которая соответствует

siE1A-1 (смысловая цепь 5'-p-aacgATATTTAAATT-CACAGCCTCcttcctgcaaGAGGCTGTGAATTTA-ATATtttttc-3', антисмысловая цепь 5'-p-tcgagaaa-aaATATTTAAATTCACAGCCTCcttcaggaagGAGGCTGTGAATTTAATATcgtt-3'), и контрольную shScr (смысловая цепь 5'-p-gatccGCCACTACATACGA-GACTTcttcctgtcaCAAGTCTCGTATGTAGTGGttttt-3', антисмысловая цепь 5'-p-aattcaaaaaCCA-CTACATACGAGACTTgtgacaggaagCAAGTCTCG-TATGTAGTGGcg-3'). В настоящей работе мы использовали также лентивирусные векторы shE2B-LeGO-G, кодирующие shРНК, направленную против мРНК гена ДНК-полимеразы *E2B* HAdV D8, D19, D36 и D37, и shScr-LeGO-G, описанные ранее [10, 11].

Проточная цитофлуориметрия

Уровень флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Epics 4XL (Beckman Coulter, США). Сбор и учет данных производили с помощью программного обеспечения WinMDI, версия 2.8.

ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК из клеточных культур выделяли с помощью TRIzol® reagent (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Полученную мРНК использовали для построения первых цепей кДНК с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). Для идентификации в полученной суммарной кДНК нуклеотидных последовательностей *E1A-D36* проводили ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к данному гену: смысловая последовательность 5'-GCATCCAGAGCCATTTGAGC-3'; антисмысловая последовательность 5'-TTA-GGGTTCGTCATCATGGGC-3'. Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию гена «домашнего хозяйства» β-актина. Уровень экспрессии гена β-актина определяли с использованием праймеров: смыслового – 5'-ATGGATGATGATATCGCCGC-3' и антисмыслового – 5'-CTTCTGACCCATGCCAC-3'. ПЦР в реальном времени проводили в 96-луночных планшетах на приборе MiniOpticon (Bio-Rad, США) с использованием реагента iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения прибора MiniOpticon (Bio-Rad).

Определение количества копий генома аденовируса человека

HAdV D8 (ATCC® VR-1085AS/RB™ ATCC® VR-1085AS/RB™) и HAdV D37 (ATCC® VR-929™) были приобретены в American-Type-Culture-Collection

(АТСС). Для оценки репликации аденовирусов группы D человека через 6 дней после инфекции клетки, зараженные HAdV D8 и D37, собирали, выделяли суммарную ДНК с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно рекомендациям производителя. Количественную ПЦР проводили согласно [29] на приборе Rotor Gene Q cycler (QIAGEN) с использованием реагента TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Продукты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения прибора Rotor Gene Q cycler (QIAGEN).

Статистическая обработка данных

Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение (СО). Статистическую значимость определяли с использованием непарного двустороннего *t*-теста и программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линий модельных клеток, экспрессирующих ген E1A HAdV D36

Для определения функциональной активности синтетических siРНК и лентивирусных векторов, направляющих в трансдуцированных клетках синтез shРНК, необходимо было получить модельные линии клеток A549 E1A и H1299 E1A, в которых экспрессируется ген E1A аденовируса типа 36 человека (E1A-D36).

Известно, что экспрессия E1A в клетках вызывает индукцию р53-зависимого апоптоза [30]. Продукты экспрессии E1A способствуют переходу покоящейся клетки в S-фазу и нарушению механизмов, контролирующих синтез ДНК. Это увеличивает вероятность возникновения повреждений ДНК в процессе репликации. В ответ на сильное повреждение ДНК белок р53 запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу. Поэтому сначала клетки A549 и H1299 трансфицировали siРНК, комплементарными различным участкам мРНК гена E1A, а также контрольной siScr. Через 24 ч проводили трансдукцию этих клеток псевдолентивирусными частицами (рис. 1А), содержащими экспрессирующую кассету «промотор – целевой ген E1A-D36 – IRES – ген флуоресцентного белка dTomato – ген устойчивости к пурамицину». Маркерный ген, кодирующий флуоресцентный белок dTomato, и целевой ген E1A разделены последовательностью IRES (внутренний сайт посадки рибосомы). IRES позволяет синтезировать несколько белков с одной мРНК в эукариотических клетках. Таким образом, целевой и маркерный гены экспрессируются с сопоставимой

эффективностью [31]. Это позволяет косвенно оценить уровень экспрессии гена E1A, измеряя флуоресценцию белка dTomato с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Эффективность экспрессии внесенных генов оценивали методами проточной цитофлуориметрии (по флуоресценции маркерного белка Tomato), а также ПЦР в реальном времени. Результаты оценки эффективности трансдукции и последующей экспрессии трансгенов с помощью проточной цитофлуориметрии приведены на рис. 1Б,В.

Количество клеток модельных линий A549 E1A и H1299 E1A, в которых регистрировали флуоресценцию белка dTomato, составляло 44 и 85% всей популяции клеток соответственно по сравнению с контролем – нетрансдуцированными клетками линий A549 и H1299.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в полученных модельных трансгенных клетках A549 E1A и H1299 E1A с высокой эффективностью экспрессируются внесенный целевой ген и маркерный ген dTomato в составе кассеты «промотор – ген E1A-D36 – IRES – маркерный ген dTomato – ген устойчивости к пурамицину».

Согласно полученным данным, в модельных линиях A549 E1A и H1299 E1A количество флуоресцирующих клеток значительно различается. Причины гетерогенности линий клеток A549 E1A и H1299 E1A по уровню экспрессии dTomato могут быть связаны с индивидуальными свойствами клеток. В геноме трансгенных клеток интегрируется разное количество молекул лентивирусного провируса. Вирусная ДНК встраивается в разные участки генома, что может обеспечивать различную эффективность экспрессии трансгенов. Несмотря на сходство морфологии и происхождения клеток A549 и H1299, одной из причин могут быть различия этих двух линий. Как известно, экспрессия гена E1A приводит к р53-зависимому апоптозу. Клетки линии H1299 дефицитны по белку р53. Следовательно, вероятность развития апоптоза в клетках H1299 E1A гораздо ниже, чем в клетках A549 E1A. Можно предположить, что клетки линии A549 трансдуцируются с той же эффективностью, что и клетки H1299, но в большинстве трансдуцированных клеток A549 E1A происходит р53-зависимый апоптоз, что позволяет регистрировать флуоресценцию dTomato в меньшем количестве клеток A549 E1A, чем в клетках модельной линии H1299 E1A.

Подавление экспрессии гена E1A-D36 под действием siРНК

Структура экспрессирующей кассеты «промотор – ген E1A-D36 – IRES – маркерный ген dTomato – ген устойчивости к пурамицину» позволяет быстро

оценить ингибирующую активность siРНК и лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК – предшественников соответствующих siРНК. Деградация общей для обоих генов мРНК под действием интерферирующих РНК, комплементарных мРНК *E1A-D36*, приводит к прекращению образования в клетке как продуктов этого гена, так и флуоресцентного белка *dTomato*, что количественно можно оценить методом проточной цитофлуориметрии.

Поскольку экспрессия гена *E1A* приводит к индукции апоптоза, эксперимент выполняли следующим образом: siРНК, комплементарные различным районам мРНК *E1A-D36*, трансфицировали в клетки линий А549 и Н1299; через 24 ч проводили трансдукцию этих клеток псевдолентивирусными частицами, содержащими экспрессирующую кассету «промотор SFFV – ген *E1A-D36* – IRES – ген флуоресцентного белка *dTomato* – ген устойчивости к пурамицину». Через 48 и 96 ч после трансдукции эффективность действия siРНК оценивали методами проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени.

В результате действия siРНК, комплементарных мРНК *E1A-D36*, значительно снижался уровень экспрессии *dTomato* (рис. 2). В популяции клеток А549 Е1А, трансфицированных siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3, средняя интенсивность флуоресценции (MFI) *dTomato* через 48 ч снизилась на 25, 49 и 53% соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 55, 61 и 58%. В качестве контроля использо-

вали клетки линии А549 Е1А, трансфицированные siScr. Определение биологической активности siРНК показало, что уже через 48 ч MFI репортерного белка *dTomato* в популяции модельных клеток Н1299 Е1А сократилась на 18, 60 и 17% под действием siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 18, 44 и 56%. Контролем служили клетки линии Н1299 Е1А, трансфицированные siScr. Все представленные результаты получены в ходе трех независимых экспериментов ($p < 0.05$).

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, хорошо согласуются с данными ПЦР в реальном времени. Влияние siРНК на уровень экспрессии мРНК *E1A-D36* в клетках модельных линий оценивали через 48 и 96 ч после трансдукции псевдолентивирусными частицами, кодирующими целевой ген (рис. 3). В клетках линии А549 Е1А через 48 ч после трансдукции под действием siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 регистрировали снижение уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* на 58, 83 и 63% соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 69, 88 и 72%. В клетках модельной линии Н1299 Е1А через 48 ч после трансдукции уровень мРНК *E1A-D36* уменьшался на 28, 71 и 46% при использовании siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 50, 69 и 47%.

Снижение средней интенсивности флуоресценции маркерного белка *dTomato* происходит медленнее

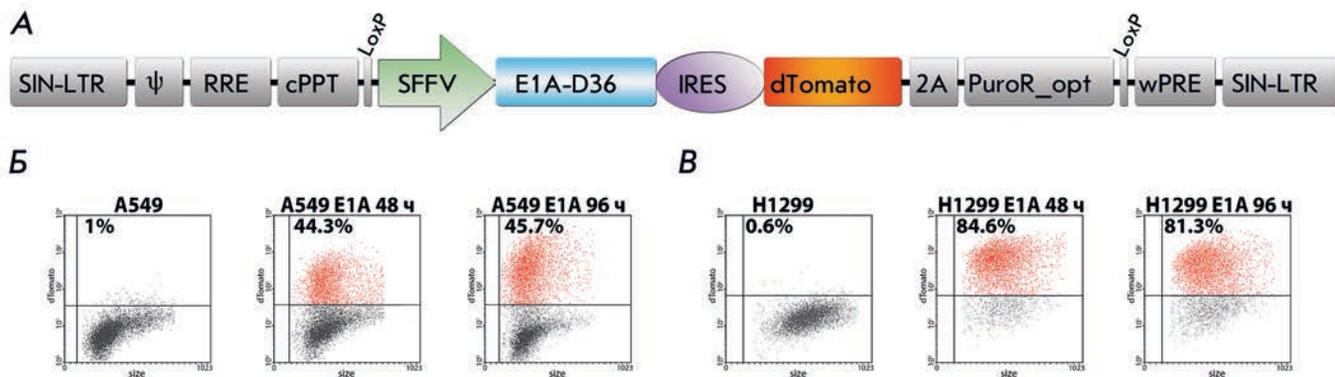


Рис. 1. Модельные линии клеток. А – схема лентивирусного вектора, несущего целевой ген *E1A-D36* и ген маркерного флуоресцентного белка *dTomato*, разделенные последовательностью IRES. Вектор сконструирован на основе вектора LeGO-iGT-Puro-opt. SIN-LTR – самоинактивирующийся (содержащий делецию промоторной области) длинный концевой повтор; ψ – сигнал упаковки; RRE – элемент, реагирующий на rev; cPPT – последовательность, богатая пуринами; SFFV – промотор вируса некроза селезенки; *E1A-D36* – ген *E1A* HAdV D36; IRES – внутренний сайт посадки рибосомы; *dTomato* – ген флуоресцентного белка *dTomato*; 2A – 2A-пептид тешовируса свиней; wPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков. Б – оценка эффективности экспрессии маркерного гена *dTomato* в клетках модельной линии А549 Е1А методом проточной цитофлуориметрии. В – анализ экспрессии маркерного гена *dTomato* в клетках модельной линии Н1299 Е1А с помощью проточной цитофлуориметрии

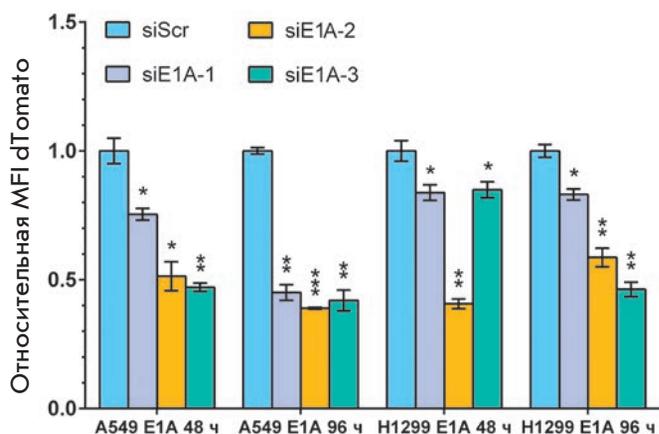


Рис. 2. Ингибирующая активность siРНК, комплементарных мРНК гена *E1A-D36*. Действие siРНК, направленных против *E1A-D36*, привело к значительному снижению средней интенсивности флуоресценции (MFI) dTomato в клетках A549 E1A и H1299 E1A. Величина MFI dTomato в контрольных образцах принята за 1. Все приведенные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

и менее эффективно, чем подавление экспрессии целевого гена на уровне мРНК. Эти данные можно объяснить тем, что флуоресцентный белок достаточно стабилен, и время его полужизни составляет около 72 ч.

Согласно данным проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени, наиболее эффективно на экспрессию гена *E1A-D36* действует siE1A-2. Ингибирующая активность siРНК определяется группой факторов. К ним относятся вторичная структура мРНК-мишени, уникальность последовательности siРНК, стабильность и термодинамическая асимметрия дуплексов siРНК. Известно, что вторичная структура мРНК-мишени или связанные с ней белки могут затруднять доступ siРНК [15, 32].

Подавление экспрессии гена *E1A-D36* с помощью лентивирусного вектора, кодирующего shРНК

Нами сконструированы лентивирусные векторы, кодирующие shРНК, соответствующие siE1A-2 (с самым высоким уровнем подавления экспрессии *E1A-D36*) и контрольной siScr. Лентивирусные векторы могут обеспечить интеграцию последовательности, кодирующей shРНК, в геном клетки, в результате чего будет достигнуто долговременное подавление экспрессии гена-мишени. Основой для таких генетических конструкций послужил лентивирусный вектор LeGO-Cerulean/BSD (рис. 4А), несущий

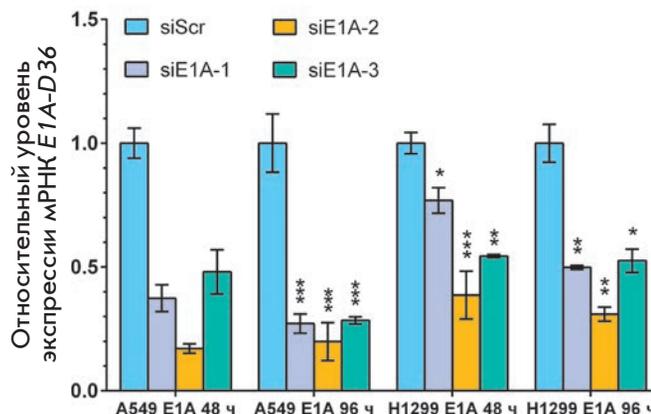


Рис. 3. Эффективность подавления экспрессии гена *E1A-D36* с помощью siРНК. Уровень экспрессии целевого гена *E1A* в клетках модельных линий A549 E1A и H1299 E1A оценивали методом ПЦР в реальном времени. Величина уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* в контрольных образцах принята за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

ген маркерного белка Cerulean и ген устойчивости к антибиотику бластицидину. В качестве контроля, иллюстрирующего отсутствие неспецифического действия shРНК, использовали вектор shScr-LeGO-Cerulean/BSD, несущий шпилечную структуру, не имеющую гомологии с известными вирусными мРНК, а также мРНК крысы, мыши и человека.

Такие лентивирусные векторы были введены в геном клеток H1299 с помощью трансдукции. Через 10 дней селекции клеток H1299 shE1A и H1299 shScr на бластицидине эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по флуоресценции репортерного белка Cerulean. Количество флуоресцирующих клеток составило 92–98% от общего числа клеток в популяции по сравнению с контролем (нетрансдуцированные клетки линии H1299).

Затем клетки модельной линии H1299 shE1A трансдуцировали псевдолентивирусными частицами E1A-LeGO-iGT. Биологическую активность shE1A оценивали через 3, 6 и 10 дней после трансдукции с помощью ПЦР в реальном времени в ходе трех независимых экспериментов ($p < 0.05$). Уровень экспрессии целевого гена *E1A* под действием shE1A снизился на 57, 77 и 80% через 3, 6 и 10 дней соответственно по сравнению с контролем (рис. 4В).

Нами показано, что лентивирусные векторы, кодирующие shРНК, существенно подавляют экспрес-

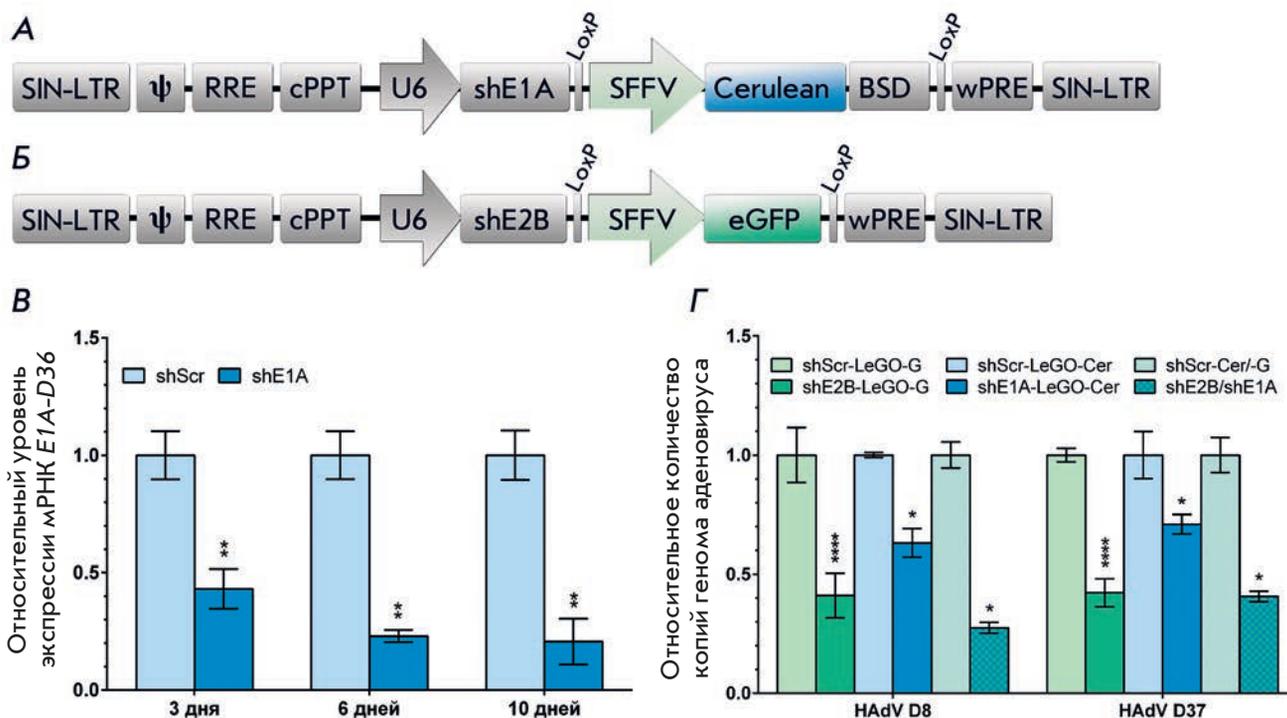


Рис. 4. Ингибирующая активность shРНК, направленных против мРНК ранних генов аденовирусов группы D человека. **А** – схема лентивирусного вектора LeGO-Cerulean/BSD, несущего шпилечную структуру shE1A, специфичную в отношении гена *E1A* HAdV D8, D19, D36 и D37. **Б** – схема лентивирусного вектора LeGO-G, несущего шпилечную структуру shE2B, специфичную в отношении гена *E2B* HAdV D8, D19, D36 и D37. SIN-LTR – самонактивирующийся (содержащий делецию промоторной области) длинный концевой повтор; ψ – сигнал упаковки; RRE – элемент, реагирующий на rev; cPPT – последовательность, богатая пуринами; U6 – промотор U6; SFFV – промотор вируса некроза селезенки; *E1A-D36* – ген *E1A* HAdV D36; IRES – внутренний сайт посадки рибосомы; *Cerulean* – ген флуоресцентного белка *Cerulean*; *eGFP* – ген флуоресцентного белка *eGFP*; *BSD* – ген устойчивости к антибиотику бластицидину; wPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков. **В** – уровень экспрессии гена *E1A-D36* в клетках H1299, экспрессирующих shE1A, через 3, 6 и 10 дней после внесения трансгена *E1A-D36*. Величина уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* в контрольных образцах принята за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (** $p < 0.01$). **Г** – подавление репликации HAdV D8 и D37 в первичных клетках лимба человека с помощью shРНК. Количество копий генома аденовируса оценено методом количественной ПЦР. Количество копий генома аденовируса в контрольных образцах принято за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$)

сию целевого гена *E1A-D36*. Необходимо добавить, что в модельных клетках в течение 10 дней сохраняется стабильное блокирование экспрессии *E1A-D36*, опосредованное экспрессирующими shРНК лентивирусными частицами. Это свидетельствует о высокой эффективности сконструированных нами лентивирусных векторов.

Подавление репликации аденовирусов группы D человека с помощью shРНК в первичных клетках лимба роговицы глаза человека

Мы оценили способность shРНК, направленных против мРНК ранних генов *E1A* и *E2B* HAdV, подавлять

репликацию вирусов. Первичные клетки лимба человека (Limb) трансдуцировали лентивирусными векторами shE2B-LeGO-G (рис. 4Б) и shE1A-LeGO-Cerulean/BSD, кодирующими shE2B и shE1A соответственно. В качестве контроля использовали клетки Limb, трансдуцированные псевдолентивирусными частицами, несущими shScr, последовательность которой не имеет гомологии с известными вирусными мРНК и мРНК мыши, крысы и человека.

Клетки полученных линий заражали HAdV D8 и HAdV D37, вызывающими эпидемический кератоконъюнктивит, с множественностью инфекции 20 ФОЕ/клетку. Клетки культивировали в течение

6 дней после заражения: этого времени достаточно для завершения полного цикла репликации аденовируса человека. Через 6 дней после инфекции эффективность действия shРНК оценивали методом количественной ПЦР по количеству копий генома HAdV D8 и HAdV D37. Мы наблюдали значительное подавление репликации аденовирусов человека в первичных клетках Limb. Количество копий генома HAdV D8 и HAdV D37 снижалось на 59 и 58% под действием shE2B, на 37 и 30% под действием shE1A, а также на 73 и 60% под действием одновременно shE2B и shE1A соответственно по сравнению с контролем (рис. 4Г).

Мы предполагаем, что в результате подавления экспрессии ранних генов аденовируса группы D человека цикл репликации аденовируса останавливается на ранней стадии. Это объясняет существенное снижение количества копий генома аденовирусов. Тем не менее нам не удалось добиться полного подавления вирусной репликации. Это можно связать с высоким значением множественности инфекции (20 ФОЕ/клетку), временем анализа образцов – 6 дней после инфекции, тогда как максимальный эффект подавления экспрессии целевых генов с помощью shРНК наблюдается на 9–10 день (рис. 4В) [10, 11], а также невысокой эффективностью трансдукции первичных клеток лимба человека (50–70% флуоресцирующих клеток в популяции по данным флуоресцентной микроскопии).

В ходе эксперимента мы использовали первичные клетки лимба человека, входящие в состав роговицы глаза человека, которая поражается при эпидемическом кератоконъюнктивите. Также мы использовали HAdV D8 и D37, основных возбудителей данного заболевания. Таким образом, нам удалось разработать модельную систему аденовирусной офтальмологиче-

ской инфекции *in vitro*, и с высокой эффективностью применить shРНК, направленные против ранних генов аденовирусов группы D человека, в качестве предполагаемых терапевтических агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработан подход к эффективному подавлению репликации аденовирусов группы D человека с помощью РНК-интерференции. С целью оценки ингибирующей активности siРНК, специфичных в отношении гена *E1A* HAdV D8, D19, D36 и D37, а также лентивирусных векторов, направляющих в клетках синтез аналогичной shРНК, мы получили модельные линии клеток, геном которых содержит экспрессирующую кассету «промотор – ген *E1A-D36* – IRES – маркерный ген *dTomato* – ген устойчивости к пуромицину». Такие модельные линии клеток позволяют быстро определять эффективность действия интерферирующих РНК, комплементарных различным участкам мРНК целевого гена.

Показана высокая эффективность таких векторов при подавлении репликации аденовирусов типов 8 и 37 группы D человека в первичных клетках лимба человека. Сочетанное действие shE1A и shE2B приводило к снижению числа копий генома аденовирусов в среднем на 70%.

Мы надеемся, что результаты нашего исследования будут полезны для разработки и создания современных лекарственных средств, высокоэффективных при заболеваниях человека, вызываемых аденовирусами. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 14-04-00821 А), а также программой Президиума РАН «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gonzalez-Lopez J.J., Morcillo-Laiz R., Munoz-Negrete F.J. // Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 2013. V. 88. № 3. P. 108–115.
- Alexeev V.N., Martynova E.B., Zhukova E.A. // Clin. Ophthalmol. Russian Med. J. 2005. V. 4. P. 146–149.
- Meyer-Rusenberg B., Loderstadt U., Richard G., Kaulfers P.M., Gesser C. // Dtsch Arztebl. Int. 2011. V. 108. № 27. P. 475–480.
- Langley J.M. // Pediatrics in Rev. 2005. V. 26. № 7. P. 244–249.
- Maychuk Y.F. // Russian Ophthalmol. J. 2008. V. 3. P. 18–25.
- Myers G.D., Krance R.A., Weiss H., Kuehnle I., Demmler G., Heslop H.E., Bollard C.M. // Bone Marrow Transplant. 2005. V. 36. № 11. P. 1001–1008.
- Trovato G.M., Martines G.F., Pirri C., Trovato F.M., Castro A., Garozzo A., Catalano D. // J. Clin. Gastroenterol. 2012. V. 46. № 6. P. e46–54.
- Skevaki C., Galani I., Pararas M., Giannopoulou K., Tsakris A. // Drugs. 2011. V. 71. № 3. P. 331–347.
- Kneidinger D., Ibrisimovic M., Lion T., Klein R. // Antiviral Res. 2012. V. 94. № 3. P. 195–207.
- Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // Biochimie. 2015. V. 113. P. 10–16. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.010
- Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // Biochimie. 2015. doi:10.1016/j.biochi.2015.05.008
- Isobe T., Hattori T., Kitagawa K., Uchida C., Kotake Y., Kosugi I., Oda T., Kitagawa M. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 41. P. 27766–27779.
- Yousef A.F., Fonseca G.J., Pelka P., Ablack J.N., Walsh C., Dick F.A., Bazett-Jones D.P., Shaw G.S., Mymryk J.S. // Oncogene. 2010. V. 29. № 33. P. 4693–4704.
- Bantounas I., Phylactou L.A., Uney J.B. // J. Mol. Endocrinol. 2004. V. 33. № 3. P. 545–557.

15. Vilgelm A.E., Chumakov S.P., Prassolov V.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 3. P. 339–354.
16. Spirin P.V., Baskaran D., Orlova N.N., Rulina A.V., Nikitenko N.A., Rubtsov P.M., Chumakov P.M., Prassolov V.S., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., et al. // *Mol. Biol.* 2010. V. 44. № 5. P. 776–786.
17. Spirin P.V., Nikitenko N.A., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Prassolov V.S., Stocking C. // *Mol. Biol.* 2011. V. 45. № 6. P. 950–958.
18. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6836. P. 494–498.
19. Lebedev T.D., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 2. P. 7–18.
20. Singer O., Verma I.M. // *Curr. Gene Ther.* 2008. V. 8. № 6. P. 483–488.
21. Manjunath N., Wu H., Subramanya S., Shankar P. // *Adv. Drug Deliv Rev.* 2009. V. 61. № 9. P. 732–745.
22. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. № 1. P. 59–74.
23. Mitsudomi T., Steinberg S.M., Nau M.M., Carbone D., D'Amico D., Bodner S., Oie H.K., Linnoila R.I., Mulshine J.L., Minna J.D., et al. // *Oncogene.* 1992. V. 7. № 1. P. 171–180.
24. Borzenok S.A., Onishchenko N.A., Tonaeva K.D., Komakh Y.A., Kovshun Y.V., Strusova N.A. // *Russian J. Transplantol. Artificial Organs.* 2014. V. 16. № 1. P. 12–20.
25. Borzenok S.A., Onischenko N.A., Tonaeva K.D., Komakh Y.A., Suskova V.S., Suskov S.I., Didenko L.V., Shevlyagina N.V., Kost E.A. // *Russian J. Transplantol. Artificial Organs.* 2012. V. 14. № 2. P. 78–85.
26. Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 4. P. 698–706.
27. Weber K., Mock U., Petrowitz B., Bartsch U., Fehse B. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 4. P. 511–520.
28. Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. Web Server issue. P. W130–134.
29. Heim A., Ebnet C., Harste G., Pring-Akerblom P. // *J. Med. Virol.* 2003. V. 70. № 2. P. 228–239.
30. Debbas M., White E. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 4. P. 546–554.
31. Zhou Y., Aran J., Gottesman M.M., Pastan I. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. № 3. P. 287–293.
32. Nikitenko N.A., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 3. P. 35–53.

УДК 577.112.6:615.214.31

Дипептидный лиганд транслокаторного белка ГД-23 проявляет анксиолитическую и ноотропную активности

П. Ю. Поварнина*, Т. А. Гудашева, О. А. Деева, С. А. Ярков, М. А. Яркова, С. Б. Середенин
Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315,

Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: povarnina@gmail.com

Поступила в редакцию 11.11.2014

РЕФЕРАТ TSPO – белок-переносчик холестерина в митохондриальный матрикс (транслокаторный белок), участвует в биосинтезе нейростероидов. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова сконструирован топологический аналог лиганда TSPO Алпидема – дипептид ГД-23 (амид N-карбобензоксид-*L*-триптофанил-*L*-изолейцина). Установлено, что ГД-23 в дозах 0.05–0.5 мг/кг (в/б) проявляет анксиолитическую активность в приподнятом крестообразном лабиринте и ноотропную активность в тесте распознавания нового объекта в условиях скополаминовой амнезии у грызунов. Показано, что ГД-23 не влияет на спонтанную двигательную активность, что исключает его седативное действие. Анксиолитическая и ноотропная активности ГД-23 блокируются антагонистом TSPO РК11195, что подтверждает участие TSPO в фармакологических эффектах дипептида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транслокаторный белок, дипептид, ГД-23, анксиолитическая активность, ноотропная активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TSPO – транслокаторный белок (translocator protein); ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; в/б – внутривенно; п/к – подкожно.

ВВЕДЕНИЕ

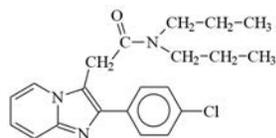
Эпидемиологические данные свидетельствуют о широком распространении тревожных расстройств [1]. В качестве анксиолитиков быстрого действия применяются бензодиазепины, связывающиеся с α - и γ -субъединицами ГАМК_A-рецептора и вызывающие аллостерически усиление трансмиссии ГАМК_A [2]. Наряду с высокой эффективностью бензодиазепины обладают рядом побочных эффектов – седацией, миорелаксацией, когнитивными нарушениями, а при их длительном применении возникают толерантность и зависимость.

В настоящее время существуют две основные стратегии разработки анксиолитиков быстрого действия, свободных от побочных эффектов. Первая состоит в создании высокоселективных агонистов α 2- и α 3-субъединиц ГАМК_A-рецепторов, опосредующих анксиолитический эффект [2]. Вторая стратегия [1] заключается в разработке фармакологически активных лигандов транслокаторного белка (TSPO), также известного как периферический бензодиазепиновый рецептор.

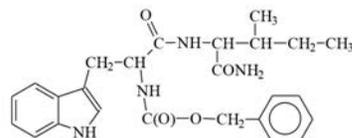
TSPO локализован на внешней мембране митохондрий в основном в клетках, продуцирующих стероидные гормоны, включая клетки центральной и периферической нервной системы [3]. TSPO участвует в трансмембранном транспорте холестерина из цитоплазмы в митохондриальный матрикс, этот процесс считается ключевым этапом синтеза нейростероидов [4]. Как известно, нейростероиды являются эндогенными лигандами ГАМК_A-рецепторов, вызывающими анксиолитическое действие. Анксиолитические свойства некоторых нейростероидов, например прегнанолона, хорошо изучены [5]. TSPO и нейростероиды вовлечены в патогенез тревожных расстройств. Так, содержание TSPO в клетках крови, а также нейростероидов в крови и спинномозговой жидкости снижено у людей с тревожными расстройствами [6, 7]. Нейростероиды и бензодиазепины связываются с разными сайтами ГАМК_A-рецептора [1], что определяет различия в их фармакологическом действии. Многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что лиганды TSPO стимулируют нейростероидогенез [5].

Лиганды TSPO изучают в качестве селективных анксиолитиков быстрого действия [5, 8].

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН с использованием стратегии создания коротких пептидов с заданной фармакологической активностью на основе структур непептидных лекарственных препаратов [9] был сконструирован топологический аналог анксиолитика Алпидема (первого соединения из группы пиразолпиримидиновых лигандов TSPO), представляющий собой замещенный дипептид амид N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23). Этот дипептид, как и Алпидем, содержит два ароматических фармакофора и один алифатический, сходным образом расположенные в пространстве относительно друг друга. ГД-23 был получен методом классического пептидного синтеза в растворе с использованием активированных N-оксисукцинимидных эфиров.



Алпидем



ГД-23

Цель данной работы состояла в выявлении фармакологического спектра действия ГД-23, включающего анксиолитический и ноотропный эффекты. Для подтверждения вовлеченности TSPO в эффекты дипептида ГД-23 анализировали его антагонизм со специфическим лигандом-антагонистом TSPO – соединением РК11195.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вещества

Амид N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23) синтезирован в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова как описано ранее [10]. $T_{пл}$ 214–216°C, $[\alpha]_D^{20} - 23^\circ$ (с 1; DMF), спектр 1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0.80 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.83 (3 H, д, $C^{\gamma}H_3$ Ile), 1.07 и 1.44 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.72 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.92 и 3.11 (2 H, два дд, $C^{\beta}H$ Trp), 4.17 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.34 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 и 4.98 (2 H, 2 д, $-OCH_2C_6H_5$), 6.95–7.28 (10 H, м, $-OCH_2C_6H_5$, индол), 7.46 (1 H, д, NH Trp), 7.77 (1 H, д, NH Ile), 7.41 и 7.13 (2 H, два с, NH_2 амид), 10.80 (1 H, с, NH индол). Элементный анализ соответствует брутто-формуле $C_{25}H_{30}N_4O_4$, данные отклоняются от теоретических не более чем на 0.4%. Хроматографическая гомогенность подтверждена методом тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ. Скополамин и ингибитор РК11195 (N-метил-N-(1-метил-пропил)амид

1-(2-хлорфенил)-изохинолин-3-карбоновой кислоты) получены в компании Sigma-Aldrich (США).

Дипептид ГД-23 и соединение РК11195 суспендировали в 0.05% водном растворе Твин-80 из расчета 2 мл/кг массы тела крыс и вводили внутрибрюшинно (в/б). ГД-23 вводили в дозах 0.05; 0.5; 0.1; 1 и 5 мг/кг (мышам и крысам), а РК11195 в дозах 10 (мышам) и 3 мг/кг (крысам) [5]. Скополамин разводили в физиологическом растворе из расчета 1 мл/кг массы тела крыс и вводили подкожно (п/к) в дозе 2 мг/кг. Контрольным животным вместо ГД-23 и/или РК11195 вводили 0.05% водный раствор Твин-80 (в/б), а вместо скополамина – физраствор (п/к).

Животные

Эксперименты были выполнены на 107 беспородных крысах-самцах массой 350–480 г, полученных в филиале «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, и 80 мышах-самцах CD1 массой 19–25 г, полученных в питомнике лабораторных животных «Пушино» при Филиале Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Животных содержали в контролируемых условиях вивария (температура 20–22°C, 12-часовой цикл освещения) при свободном доступе к пище и воде. Эксперименты выполняли в светлое время суток с 10.00 до 14.00 ч по местному времени. Животных распределяли по группам произвольным образом по критерию массы тела. Перед опытом животных выдерживали в экспериментальной комнате в «домашних» клетках в течение 24 ч. При работе соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Все манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией Института (протокол заседания № 1 от 15.09.2014).

ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГД-23

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Метод ПКЛ широко используется в настоящее время для оценки анксиолитического действия [11].

Установка ПКЛ для мышей была выполнена из поливинилхлорида серого цвета и представляла собой две пересекающиеся под прямым углом горизонтальные дорожки 65 × 5 см. Два противоположных отсека имели непрозрачные вертикальные стенки высотой 15 см. Лабиринт был приподнят от пола на 40 см. В месте перекрестия плоскостей находилась открытая центральная платформа размером 5 × 5 см. Животное помещали в центр уста-

новки. В течение 5 мин регистрировали число заходов и время пребывания в закрытых и открытых рукавах. Анксиолитическую активность ГД-23 оценивали на основе следующих параметров: времени, проведенного в открытых рукавах; числа заходов в открытые рукава, а также наиболее адекватного параметра (не зависящего от уровня двигательной активности и времени, проведенного в центре установки) – времени в открытых рукавах и числа заходов в открытые рукава в процентах по отношению соответственно к суммарному времени и к числу заходов в открытые и закрытые рукава [11].

Дизайн исследования

Дипептид ГД-23 вводили животным за 30 мин до теста. В эксперименте по изучению антагонизма ГД-23 с блокатором TSPO соединение РК11195 вводили за 30 мин до ГД-23.

ИЗУЧЕНИЕ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ГД-23

Тест распознавания нового объекта

Тест распознавания нового объекта основан на естественном для животных предпочтении новизны и позволяет оценить рабочую память [12]. Крысу сажали в клетку Т4 с опилками, идентичную ее домашней клетке, и давали ей 5 мин для адаптации. В качестве объектов использовали банки с жидкостью объемом 0.33 л: металлические, герметично закрытые металлическими крышками, желто-оранжевого цвета, и стеклянные, герметично закрытые, зеленого цвета. Критериями выбора объектов служили различия по форме, цвету и материалу при примерно одинаковом размере; вес, достаточный для того, чтобы крыса не могла их легко уронить и перемещать по клетке; относительно простая форма, не предполагающая предпочтительность для животного одного объекта перед другим.

Тест состоял из фазы ознакомления и тестовой фазы. В фазу ознакомления в два ближайших угла клетки помещали два одинаковых незнакомых для крысы объекта. В течение 4 мин регистрировали время исследования крысой каждого объекта, после чего объекты убирали. Перерыв между фазой ознакомления и тестом – 3 мин, в это время животное оставляли в клетке, где проводился тест. В фазу теста в те же углы клетки, что и в фазу ознакомления, помещали новую пару объектов, в которой один объект был идентичен объектам, предъявлявшимся ранее, а второй был незнакомым. В течение 4 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Положения знакомого и нового объектов (правый и левый угол) меняли от животного к животному. Перед каждым тестом объекты протирали

спиртом для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным. Исследованием считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта. Для оценки рабочей памяти крыс использовали коэффициент дискриминации (K_d) [13], который рассчитывали по формуле: $K_d = (\text{время (нов)} - \text{время (знаком)}) / (\text{время (нов)} + \text{время (знаком)}) \times 100\%$, где «время (нов)» и «время (знаком)» – время исследования нового и знакомого объектов в фазу теста соответственно.

Дизайн исследования

Амнезия, вызванная блокатором центральных м-холинорецепторов скополамином, используется в качестве модели для выявления ноотропных свойств фармакологических соединений [14, 15].

ГД-23 вводили за 1 ч до скополамина. Через 30 мин после введения скополамина проводили тест распознавания нового объекта. В эксперименте по изучению антагонизма ГД-23 с блокатором TSPO соединение РК11195 вводили через 30 мин после ГД-23. Через 30 мин после инъекции скополамина проводили тест распознавания нового объекта.

Статистическая обработка

Межгрупповые различия анализировали с помощью непараметрического U -критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные представляли в виде средних и стандартных отклонений или в виде медиан и интерквартильных интервалов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ГД-23 проявляет анксиолитическую активность в тесте ПКЛ

В тесте ПКЛ дипептид ГД-23 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг статистически значимо увеличивал как время пребывания мышей в открытых рукавах (в 5–6 раз по сравнению с контролем), так и число заходов в открытые рукава (в 2–3 раза). Кроме того, ГД-23 в 5–6 раз увеличивал время (%) пребывания в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах, что считается наиболее адекватным критерием анксиолитического действия (табл. 1). Таким образом, ГД-23 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг проявлял выраженную анксиолитическую активность.

Анксиолитический эффект ГД-23 зависит от взаимодействия с TSPO

Предварительное введение антагониста TSPO – соединения РК11195 – в дозе 10.0 мг/кг практически полностью блокировало анксиолитический эффект

Таблица 1. Влияние соединения ГД-23 на поведение беспородных мышей CD1 в тесте ПКЛ

| ГД-23, доза, мг/кг | Время в открытых рукавах, с | Время в закрытых рукавах, с | Число заходов в открытые рукава | Число заходов в закрытые рукава | Время в открытых рукавах /сумма времени в открытых и закрытых рукавах, % | Число заходов в открытые рукава /число заходов в открытые и закрытые рукава, % |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|--|
| Контроль | 14.25 (7.21) | 232.88 (38.16) | 1.88 (1.46) | 7.50 (2.07) | 6.06 (3.56) | 19.43 (12.56) |
| 0.1 | 81.88* (32.40) | 146.75* (43.57) | 4.38* (1.51) | 9.25 (3.62) | 36.58* (15.71) | 33.69 (13.17) |
| 0.5 | 77.25* (42.53) | 198.13 (50.87) | 4.13* (2.36) | 10.00 (3.85) | 28.48* (16.51) | 27.79 (7.39) |
| 1.0 | 20.50 (6.05) | 235.25 (19.51) | 1.88 (1.46) | 7.75 (2.05) | 8.00 (2.36) | 18.03 (7.75) |
| 5.0 | 14.25 (7.21) | 232.88 (38.16) | 1.88 (1.46) | 7.50 (2.07) | 6.06 (3.56) | 19.43 (12.56) |

Примечания. Данные представлены в виде $M(SD)$, где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; в каждой группе было по восемь животных; * $p < 0.01$ по сравнению с группой «Контроль» (U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

Таблица 2. Влияние специфического ингибитора TSPO РК11195 на анксиолитический эффект ГД-23

| Экспериментальные группы | Время в открытых рукавах, с | Время в закрытых рукавах, с | Число заходов в открытые рукава | Число заходов в закрытые рукава | Время в открытых рукавах /сумма времени в открытых и закрытых рукавах, % | Число заходов в открытые рукава /число заходов в открытые и закрытые рукава, % |
|--|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|--|
| Контроль | 41.50 (15.99) | 131.00 (18.02) | 3.13 (2.23) | 8.25 (1.91) | 23.87 (7.58) | 25.78 (13.16) |
| РК11195 (10 мг/кг) | 30.13 (26.82) | 167.25 (13.92)* | 3.00 (2.98) | 8.63 (2.39) | 14.43 (11.82) | 22.20 (17.77) |
| ГД-23 (0.5 мг/кг) | 105.50* (27.93) | 106.88* (9.51) | 7.38* (1.06) | 7.63 (1.41) | 48.99** (7.87) | 49.33** (7.59) |
| РК11195 (10.0 мг/кг) + ГД-23 (0.5 мг/кг) | 50.00# (26.60) | 125.13 (22.92) | 5.38 (2.88) | 9.38 (3.11) | 27.15## (11.08) | 35.11# (9.35) |

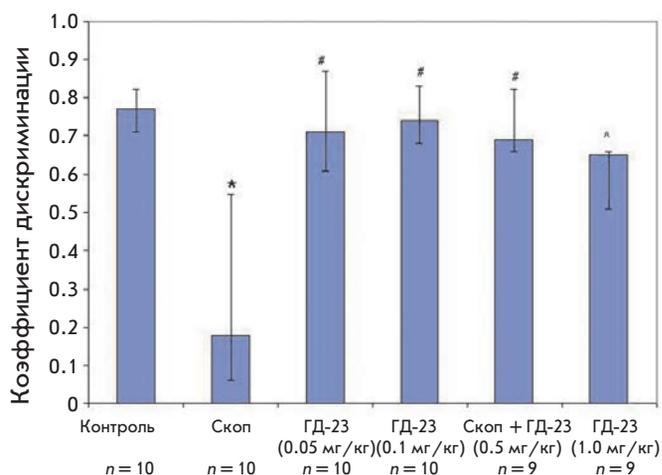
Примечания. Данные представлены в виде $M(SD)$, где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; в каждой группе было по восемь животных; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с группой «ГД-23(0.5 мг/кг)» (U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

ГД-23 в тесте ПКЛ (табл. 2). У животных, получивших инъекцию РК11195 перед ГД-23, время в открытых рукавах и процент времени в открытых рукавах снижались практически до уровня в контроле. Процент заходов в открытые рукава также снижался по сравнению с группой, получившей только ГД-23. При этом сам РК11195 в дозе 10.0 мг/кг не влиял на параметры, связанные с тревожностью, а именно, время и число заходов в открытые рукава, а также процент времени и процент заходов в открытые рукава. Таким образом, антагонизм РК11195 и ГД-23 связан, по-видимому, с конкуренцией за одну и ту же молекулярную мишень. Это свидетельствует о зави-

симости анксиолитического действия ГД-23 от взаимодействия с рецепторным участком TSPO.

ГД-23 улучшает рабочую память крыс в условиях скополаминовой амнезии

Не выявлено межгрупповых различий по суммарному времени исследования объектов в фазу ознакомления и в фазу теста, т.е. уровень исследовательской активности в группах был примерно одинаковым. В тестовую фазу контрольные животные значительно больше времени исследовали новый объект, чем знакомый. Введение скополамина значительно ухудшало способность животных к распознаванию



ГД-23 противодействует скополаминовой амнезии в тесте распознавания нового объекта. ГД-23 вводили в/б за 1 ч до скополамина (0.2 мг/кг, п/к). Через 30 мин после введения скополамина проводили тест распознавания нового объекта. Коэффициент дискриминации, отражающий разницу между временем исследования нового и знакомого объектов по отношению к суммарному времени исследования нового и знакомого объектов в фазу теста, рассчитывали по формуле: $K_d = (\text{время (нов)} - \text{время (знаком)}) / (\text{время (нов)} + \text{время (знаком)})$. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных интервалов. n – число животных в группах; *p < 0.05 по сравнению с контролем, #p < 0.05 и по сравнению с группой «скополамин» (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони)

объектов, что выражалось в уменьшении K_d в группе «скополамин» примерно в 4 раза по сравнению с контролем.

Дипептид ГД-23 в дозе 0.05, 0.1 и 0.5 мг/кг статистически значимо противодействовал скополаминовой амнезии с наиболее выраженным эффектом в дозе 0.1 мг/кг, а в дозе 1.0 мг/кг вызывал тенденцию к снижению эффекта скополамина (рисунки).

Ноотропный эффект ГД-23 в условиях скополаминовой амнезии у крыс обусловлен взаимодействием с TSPO

Введение антагониста TSPO РК11195 полностью блокировало ноотропный эффект ГД-23. Коэффициенты дискриминации (отражающие рабочую память) у крыс, получивших ГД-23 и РК11195 на фоне скополаминовой амнезии, и у животных, получивших только скополамин, не отличались (табл. 3). Сам РК11195 не влиял на поведение животных в данном тесте. Таким образом, как и в случае анксиолитического эффекта, ноотропный эффект ГД-23 обусловлен, по-видимому, его взаимодействием с TSPO.

Таблица 3. Антагонист TSPO РК11195 противодействует ноотропному эффекту ГД-23 в условиях скополаминовой амнезии у крыс в тесте распознавания нового объекта

| Группа | n | Коэффициент дискриминации |
|-----------------------------|----|---------------------------|
| Контроль | 8 | 0.8 (0.75–0.9) |
| Скополамин | 9 | 0.08 (0.03–0.24)* |
| Скополамин + ГД23 | 10 | 0.66 (0.52–0.95)# |
| Скополамин + ГД23 + РК11195 | 9 | 0.14 (-0.1–0.42)^ |
| Скополамин + РК11195 | 7 | 0.4 (0.23–0.44) |
| РК 11195 | 6 | 0.8 (0.64–0.99) |

Примечания. ГД-23 (0.1 мг/кг, в/б) вводили за 1 ч до скополамина (0.2 мг/кг, п/к). РК11195 (3 мг/кг, в/б) вводили через 30 мин после ГД-23 и за 30 мин до скополамина. Через 30 мин после введения скополамина проводили тест распознавания нового объекта. Коэффициент дискриминации, отражающий разницу между временем исследования нового и знакомого объектов по отношению к суммарному времени исследования нового и знакомого объектов в фазу теста, рассчитывали по формуле: $K_d = (\text{время (нов)} - \text{время (знаком)}) / (\text{время (нов)} + \text{время (знаком)})$. n – число животных в группах, *p < 0.05 по сравнению с контролем, #p < 0.01 по сравнению с группой «скополамин», ^ – p < 0.01 по сравнению с группой «ГД23 + скополамин» (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных интервалов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что дипептидное соединение ГД-23, сконструированное на основе первого представителя группы пирозолпиримидиновых лигандов TSPO Алпидема, обладает выраженной анксиолитической и ноотропной активностями в интервале доз 0.05–0.5 мг/кг при в/б введении. Анксиолитическая и ноотропная активности ГД-23 практически полностью блокируются антагонистом TSPO РК11195, что свидетельствует об участии TSPO в фармакологических эффектах ГД-23.

Лиганды TSPO с анксиолитической активностью разрабатываются рядом научных групп. Так, в Институте фармакологии и токсикологии Пекина (КНР) разрабатывается соединение YL-IPA08 [N-этил-N-(2-пиридинилметил)-2-(3,4-ихлорфенил)-7-метилимидазо-[1,2-a]-пиридин-3-ацетамидгидрохлорид], которое проявляет анксиолитическую и антидепрессивную активности при пероральном введении на модели постстрессового тревожного расстройства у мышей, а также увеличивает содержание аллопрегнанолона в коре голов-

ного мозга и плазме крови у крыс на той же модели [8]. В настоящее время это соединение находится на этапе доклинических исследований. В компании Dainippon Pharmaceutical (Осака, Япония) изучено соединение AC-5216 (XBD173, [N-бензил-N-этил-2-(7,8-дигидро-7-метил-8-оксо-2-фенил-9H-пурин-9-ил)ацетамид]), обладающее при пероральном применении анксиолитической и антидепрессивной активностью в ряде тестов, при этом не оказывающее миорелаксирующего эффекта и не ухудшающее память [5]. К сожалению, клинические испытания соединения XBD173 были прекращены на фазе II в связи отсутствием выраженного терапевтического эффекта [ClinicalTrials.gov identifier: NCT00108836].

Известные на настоящий момент лиганды TSPO – это изохинолиновые карбоксамиды, бензоксазепины, производные индола, имидазопиридины, производные феноксифенилацетамида, пиразолопиримидины [16]. Нами впервые создан лиганд TSPO пептидной природы. Преимуществами пептидных препаратов являются высокая активность, низкая токсичность, меньшая вероятность развития толерантности и зависимости.

Соединение ГД-23 проявляет не только выраженную анксиолитическую активность, но и ноотропный эффект на модели скополаминовой амнезии. Этот эффект ГД-23 можно предположительно объяснить, как и его анксиолитический эффект, стимуляцией синтеза нейростероидов, характерной для агони-

стов TSPO. Известно, что некоторые нейростероиды, в частности аллопрегнанолаон, дегидроэпиандростерон, кортизол и кортикостерон, стимулируют память и обучение, а снижение их содержания при различных патологических состояниях или при старении коррелирует с когнитивным дефицитом [17]. Таким образом, в отличие от бензодиазепинов, одним из побочных эффектов которых является ухудшение когнитивных функций, ГД-23 обладает ноотропными свойствами. Причем эти свойства ГД-23 проявляет в тех же дозах, что и анксиолитические. Кроме того, ГД-23 не влияет на спонтанную двигательную активность мышцей (данные не приводятся), что свидетельствует об отсутствии у ГД-23 в изученном диапазоне доз седативных свойств.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки дипептидного лиганда TSPO ГД-23 в качестве потенциального анксиолитика быстрого действия, не обладающего побочными эффектами бензодиазепинов. ●

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014 год, проект «Конструирование, синтез и выявление фармакологических свойств оригинальных лигандов митохондриального транслокаторного белка TSPO».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nothdurfter C., Baghai T.C., Schüle C., Rupprecht R. // Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2012. V. 262. № 2. P. 107–112.
2. Rudolph U., Knoflach F. // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. V. 10. № 9. P. 685–697.
3. Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T.C., Fan J., Akula N., Groyer G., Adams D., Schumacher M. // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. V. 9. № 12. P. 971–988.
4. Lacapère J.J., Papadopoulos V. // Steroids. 2003. V. 68. № 7–8. P. 569–585.
5. Kita A., Kohayakawa H., Kinoshita T., Ochi Y., Nakamichi K., Kurumiya S., Furukawa K., Oka M. // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142. № 7. P. 1059–1072.
6. Nothdurfter C., Rammes G., Baghai T.C., Schüle C., Schumacher M., Papadopoulos V., Rupprecht R. // J. Neuroendocrinol. 2012. V. 24. № 1. P. 82–92.
7. Pinna G., Rasmusson A.M. // J. Neuroendocrinol. 2012. V. 24. № 1. P. 102–116.
8. Zhang L.M., Qiu Z.K., Zhao N., Chen H.X., Liu Y.Q., Xu J.P., Zhang Y.Z., Yang R.F., Li Y.F. // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2014. V. 17. № 10. P. 1659–1669.
9. Гудашева Т.А. // Вестник РАМН. 2011. № 7. С. 8–16.
10. Гудашева Т.А., Деева О.А., Мокров Г.В., Ярков С.А., Яркова М.А., Середенин С.Б. // ДАН. 2015. Т. 464. № 3. С. 361–364.
11. File S.E. // Behav. Brain Res. 2001. V. 125. № 1–2. P. 151–157.
12. Ennaceur A., Delacour J. // Behav. Brain Res. 1988. V. 31. № 1. P. 47–59.
13. Barsegyan A., McGaugh J.L., Roozendaal B. // Front. Behav. Neurosci. 2014. № 8. P. 160.
14. Verloes R., Scotto A.M., Gobert J., Wülfert E. // Psychopharmacology (Berl.). 1988. V. 95. № 2. P. 226–230.
15. Горелов П.И., Островская Р.У., Сазонова Н.М. // Эксп. клин. фармакол. 2013. V. 76. № 7. P. 3–5.
16. James M.L., Selleri S., Kassiu M. // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. № 17. P. 1991–2001.
17. Vallee M., Mayo W., Koob G.F., Le Moal M. // Int. Rev. Neurobiol. 2001. № 46. P. 273–320.

УДК 577.113.3

Производные 5-ариламиноурацила как потенциальные фармакологические агенты двойного действия

Е. С. Матюгина¹, М. С. Новиков², Д. А. Бабков², В. Т. Валуев-Элистон¹, К. Ванпуть³,
С. Зикари³, А. Корона⁴, Е. Трамонтано⁴, Л. Марголис^{3*}, А. Л. Хандажинская^{1**}, С. Н. Кочетков¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

³Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

⁴Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Monserrato, 09042, Italy

*E-mail: margolil@helix.nih.gov

**E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 27.01.2015

РЕФЕРАТ Показано, что производные 5-ариламиноурацила, ранее продемонстрировавшие способность в концентрации 5–40 мкг/мл ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, являются также неконкурентными нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ-1, не проявляющими токсичности *in vitro* (на клетках МТ-4) и *ex vivo* (ткань миндалин человека).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА производные 5-(фениламино)урацила, 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, сочетанные инфекции ВИЧ и *Mycobacterium tuberculosis*, двойное действие.

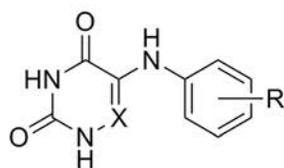
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ТБ – туберкулез; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; НИИОТ ВИЧ – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека.

ВВЕДЕНИЕ

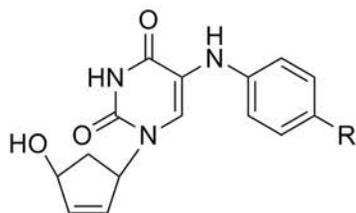
На сегодняшний день ВИЧ-инфекция и туберкулез (ТБ) считаются основными причинами смертности от инфекционных заболеваний в мире. Согласно последним оценкам ВОЗ, в 2013 году туберкулезом заболели 9 млн человек, умерли – 1.5 млн (из них у 360000 ТБ был ассоциирован с ВИЧ) [1]. В 2013 году в мире насчитывалось 35 млн больных СПИДом. В 2013 году ВИЧ-инфекция была выявлена у 2.1 млн человек, от СПИДа умерли 1.5 млн, причем ТБ остается основной причиной смерти больных с двойным инфицированием (66.5%) [2]. У ВИЧ-инфицированных повышен риск реактивации латентной формы туберкулеза (50% по сравнению с 10%), у больных ТБ ВИЧ-инфицированных отмечается высокий риск летального исхода. ВИЧ-инфицированные лица, принимающие противотуберкулезные препараты в стандартном 6-месячном режиме, имеют больший риск развития рецидива, чем

больные туберкулезом, получающие более длительный курс терапии [3]. Таким образом, одновременное заражение ТБ и ВИЧ представляет собой очень серьезную проблему и делает актуальным поиск препаратов двойного действия.

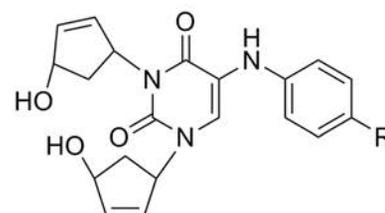
Недавно нами было показано, что определенные производные 5-ариламиноурацила обладают способностью влиять на активное деление клеток *Mycobacterium tuberculosis*. Полное ингибирование роста микобактерий соединениями (2), (3), (6), (7), (10), (15)–(17) и (19) (рис. 1) наблюдалось в концентрациях 5–40 мкг/мл, причем одно из них (19) проявило более высокую активность против штамма MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью, включая пять основных противотуберкулезных препаратов первой линии (изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и пиперазидин), чем в отношении чувствительного лабораторного штамма H37Rv [4].



(1)–(8): X = CH; (9)–(10): X = N
 (1): R = H; (2): R = 3-Me; (3): R = 4-Me;
 (4): R = 2,3-Me₂; (5): R = 2,5-Me₂;
 (6): R = 4-nBu; (7): R = 4-nBuO;
 (8): R = 4-PhO; (9): R = H; (10): R = 4-nBu



(11): R = H; (12): R = Me; (13): R = nBu;
 (14): R = nBuO; (15): R = PhO



(16): R = H; (17): R = Me; (18): R = nBu;
 (19): R = nBuO; (20): R = PhO

Рисунок 1.

Данная работа посвящена оценке производных 5-ариламиноурацила в качестве ННИОТ ВИЧ и более детальному изучению токсичности представительей соединений данной группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (1)–(20) были синтезированы как описано ранее [4].

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-5-(фениламино)урацил (21)

К раствору соединения (11) (50 мг, 0.18 ммоль) в 5 мл диметилформамида (ДМФА) добавляли K₂CO₃ (36 мг, 0.26 ммоль) и VnBr (42 мкл, 0.35 ммоль). Реакционную массу перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ. Растворитель удаляли в вакууме масляного насоса. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали системой CHCl₃–CH₃OH (98 : 2). Получили 43 мг продукта (21) (66%) в виде желтоватого порошка. R_f = 0.32 (CHCl₃–CH₃OH, 98 : 2). ¹H-ЯМР (CHCl₃): 7.50–7.49 (2H, м, H₃, H₅-Bn), 7.32–7.23 (6H, м, H₂, H₃, H₅, H₆, H₂, H₆-Bn), 6.95–6.93 (2H, м, H₃, H₄-Bn), 6.90–6.88 (1H, т, H₄), 6.20–6.18 (1H, м, H₂), 6.01 (1H, с, NH), 5.84–5.82 (1H, м, H₃), 5.61–5.58 (1H, м, H₁), 5.23–5.16 (2H, д, J = 13.70, CH₂), 4.84–4.83 (1H, м, H₄), 2.86–2.85 (1H, м, H_{a5}), 1.70–1.66 (1H, м, H_{b5}). ¹³C-ЯМР (CHCl₃): 160.80, 149.73 (C-4, C-2), 142.34 (C-4''), 139.24 (C-2'), 138.19 (C-4 Bn), 132.40 (C-3'), 129.63 (C-3'', C-5''), 129.34 (C-3, C-5 Bn), 128.63 (C-2'', C-6''), 127.91 (C-1''), 121.18 (C-1 Bn), 119.50 (C-5), 117.19 (C-6), 113.11 (C-2, C-6, Bn), 74.99 (C-1'), 61.05 (C-4'), 45.49 (C-5'), 39.94 (CH₂).

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-5-(n-метилфениламино)урацил (22)

Синтез проводили аналогично (21) исходя из соединения (12). Получили 35 мг продукта (22) (68%) в виде бело-желтого порошка. R_f = 0.43 (CHCl₃–CH₃OH, 98 : 2). ¹H-ЯМР (CHCl₃): 7.50–7.48 (2H, м, H₃, H₅-Bn), 7.31–7.23 (4H, м, H₂, H₄, H₆-Bn, H₅), 7.06–7.04 (2H, м, H₃, H₅), 6.87–6.85 (2H, м, H₂, H₆), 6.18–6.16 (1H, м,

H₂), 5.94 (1H, с, NH), 5.83–5.81 (1H, м, H₃), 5.58–5.56 (1H, м, H₁), 5.23–5.16 (2H, д, J = 13.76, CH₂), 4.84–4.82 (1H, м, H₄), 2.87–2.83 (1H, м, H_{a5}), 2.26 (3H, с, CH₃), 1.69–1.65 (1H, м, H_{b5}). ¹³C-ЯМР (CHCl₃): 160.75, 149.66 (C-4, C-2), 139.57 (C-4''), 139.14 (C-2'), 138.19 (C-4 Bn), 132.40 (C-3'), 130.14 (C-3'', C-5''), 129.33 (C-3, C-5, Bn), 128.67 (C-2'', C-6''), 127.88 (C-1''), 120.23 (C-1, Bn), 117.86 (C-2, C-6, Bn), 117.66 (C-5), 114.39 (C-6), 75.02 (C-1'), 61.12 (C-4'), 45.45 (C-5'), 39.94 (CH₂), 20.76 (CH₃).

Анти-ВИЧ-активность

Выделение рекомбинантной обратной транскриптазы ВИЧ-1 (гетеродимер р66/р51) и определение ее активности проводили как описано ранее [5, 6]. В качестве количественной характеристики ингибиторной активности соединений использовали константу ингибирования (K_i), рассчитанную по методу Диксона [7], для неконкурентных ингибиторов. В качестве контроля использовали ННИОТ первого поколения – невирапин.

Цитотоксичность *in vitro*

Препараты испытывали на цитотоксичность на культурах клеток МТ-4 с использованием автоматической системы подсчета клеток (ChemoMetec). Число жизнеспособных и мертвых клеток подсчитывали в контрольных и обработанных препаратами (6), (7) или (19) культурах. Препараты (6) и (7) тестировали в концентрациях 0.136–33 мкМ (0.035–9 мкг/мл), а препарат (19) – в концентрациях 0.272–66 мкМ (0.119–28 мкг/мл).

Жизнеспособные и мертвые клетки различали по накоплению йодата пропидия согласно инструкции производителя. Данные накапливали и анализировали с помощью программы Nucleoview (версия 1.0 ChemoMetec).

Токсичность *ex vivo*

Цитотоксичность препаратов (6), (7) и (19) определяли в тканях миндалин человека. Для каждой экспериментальной точки 27 тканевых фрагментов инкубировали с препаратом (19) (20 мкг/мл)

или с препаратами (6) или (7) (5 мкг/мл). Фрагменты ткани культивировали в течение 12 дней. Затем из контрольных и опытных образцов выделяли клетки, которые окрашивали комбинациями флуоресцентно меченных антител против CD3-QD605, CD4-QD655, CD8-QD705, CD25-APC, CD38-PE, HLA-DR-APC-Cy7, CXCR4-Brilliant violet 421, CCR5-PR-Cy5 CD45RA-FITC и CCR7-PE-Cy7 (Caltag Laboratories; Biolegend). Количество клеток различных фенотипов в выделенных суспензиях определяли с помощью проточной цитофлуорометрии как описано ранее [8]. Объем анализируемой суспензии контролировали с помощью бусинок Trucount (Becton Dickinson), подсчитанное число клеток нормировали по весу тканевых фрагментов, из которых они были выделены.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурное подобие соединений (1)–(20) синтезированным нами ранее производным урацила, которые являются ННИОТ ВИЧ [9, 10], дало нам основание предположить, что и эти вещества могут обладать сходными свойствами. Соединения (1)–(20) принадлежат к двум группам: (1)–(10) представляют собой 5-ариламинопроизводные урацила, а (11)–(20) содержат один или два дополнительных 4'-гидроксициклопентеновых фрагмента и могут, таким образом, рассматриваться как 5'-норкарбоциклические аналоги 2',3'-дидезокси-2',3'-уридина. Несмотря на известную структурную близость с нуклеозидами, 5'-норкарбоциклические аналоги способны ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ по неконкурентному механизму, связываясь в так называемом гидрофобном «центре связывания ненуклеозидных ингибиторов» [9, 10]. Однако соединения (1)–(20), ингибирующие рост *M. tuberculosis*, не обладали способностью ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 ($K_i \gg 200$ мкМ). Единственным исключением стало соединение (15) ($K_i = 119$ мкМ), относящееся к классу 5'-норкарбоциклических аналогов уридина.

С целью повышения анти-ВИЧ-активности представителей данного класса путем увеличения их гидрофобности были синтезированы N³-бензилпроизводные (21) и (22) (рис. 2). Эти соединения были получены с приемлемыми выходами (61–69%) реакцией исходных карбоциклических аналогов (11) и (12) с бензилбромидом в присутствии поташа. Структуры и чистота синтезированных соединений были подтверждены методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и ТСХ. Ингибиторная активность производного (22) в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1 оказалась несколько выше, чем у (21) ($K_i = 60$ и >100 мкМ соответственно) и исходных соединений (11) и (12).

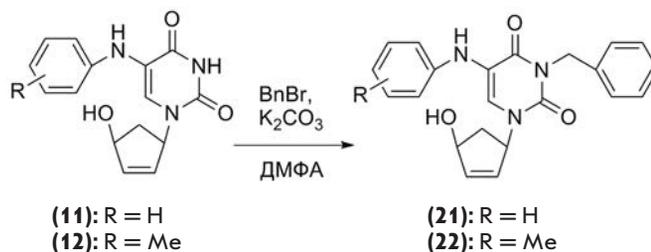


Рисунок 2.

Ранее мы оценили цитотоксичность синтезированных соединений на культурах клеток Vero, A₅₄₉, Huh7 и показали, что они нетоксичны вплоть до концентрации 50 мкг/мл ($CD_{50} \gg 100$ мкМ). Токсичность соединений (6), (7) и (19), проявивших наиболее выраженные противотуберкулезные свойства, мы дополнительно исследовали *in vitro* на культуре клеток MT-4 и *ex vivo* на системе ткани миндалин человека.

На клетках MT-4 соединения не проявили ни цитотоксических, ни цитостатических свойств в концентрациях вплоть до максимальных: 66 мкМ для (19), 33 мкМ для (6) и (7).

Оценка цитотоксичности соединений (20 мкг/мл для (19) и 5 мкг/мл для (6) и (7)) на разных типах клеток в тканевой системе показала отсутствие существенной гибели Т-клеток (CD3⁺), В-клеток (CD3⁻), CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также подгрупп CD4⁺ лимфоцитов: наивных (CD45RA⁺/CCR7⁺), центральных клеток памяти (CD45RA⁻/CCR7⁺), эффекторных клеток памяти (CD45RA⁻/CCR7⁻), дифференцированных эффекторных клеток памяти (Temra, CD45RA⁺/CCR7⁻), а также активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Последние определяли как CD4⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD38⁺ Т-клетки или CD4⁺/HLA-DR⁺. Во всех этих группах число клеток в обработанных препаратами и контрольных тканях не различалось.

Таким образом, хотя новые производные 5-ариламиноурацила и не показали значительной анти-ВИЧ-активности, однако, даже слабая активность соединений (15) и (22) говорит о наличии их сродства к обратной транскриптазе ВИЧ-1. Структурное подобие соединений такого типа многим высокоактивным противовирусным агентам ненуклеозидной природы, применяемым при ВИЧ-инфекции в качестве компонентов комплексной высокоинтенсивной антиретровирусной терапии [11], в сочетании с выраженной противотуберкулезной активностью делает их интересными для дальнейших модификаций. ●

Работа поддержана в рамках проекта
 № 13-04-91441 НИЗ совместной программы
 РФФИ – Национальные институты здоровья
 (США) и проекта РФФИ № 13-04-00742.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2014. WHO. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_executive_summary.pdf?ua=1
2. Global HIV report 2014. WHO. http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1.
3. Nahid P, Gonzalez L.C., Rudoy I., de Jong B.C., Unger A., Kawamura L.M., Osmond D.H., Hopewell P.C., Daley C.L. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V. 175. P. 1199–1206.
4. Matyugina E.S., Novikov M.S., Babkov D.A., Ozerov A.A., Chernousova L.N., Andreevskaya S.A., Smirnova T.G., Karpenko I.L., Chizhov A.O., Muthu P., et al. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2015. Accepted article: DOI: 10.1111/cbdd.12603.
5. 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.
6. Le Grice S.F., Grüniger-Leitch F.R. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 187. P. 307.
7. Dixon M. // *Biochem. J.* 1953. V. 55. № 1. P. 170–171.
8. Grivel J.-C., Margolis L. // *Nature Protocols*. 2009. V. 4. P. 256–269.
9. Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Novikov M.S., Ivanov A.V., Kochetkov S.N., Balzarini J., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // *Med. Chem. Commun.* 2013. V. 4. P. 741–748.
10. Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Geisman A.N., Novikov M.S., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // *Med. Chem. Commun.* 2013. V. 4. P. 1443–1451.
11. Tanaka H., Baba M., Saito S., Miyasaka T., Takashima H., Sekiya K., Ubasawa M., Nitta I., Walker R.T., Nakashima H., et al. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. № 4. P. 1508–1511.

УДК 616-006.441; 616.155.321

Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме

Ю. В. Сидорова¹, Н. Г. Чернова¹, Н. В. Рыжикова¹, С. Ю. Смирнова¹, М. Н. Сеницына¹, Ю. Е. Виноградова², У. Л. Джулакян¹, А. М. Ковригина¹, Е. Е. Звонков¹, А. Б. Судариков^{1*}

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

²Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова, кафедра госпитальной терапии № 2, 119435, Москва, Б. Пироговская ул., 4

*E-mail: dusha@blood.ru

Поступила в редакцию 24.03.2015

РЕФЕРАТ Определяли целесообразность и информативность молекулярно-генетического исследования клональности при периферической Т-клеточной лимфоме (ПТКЛ). Анализировали биоптаты пораженных органов, кровь и костный мозг 30 пациентов с диагнозом периферическая Т-клеточная лимфома. Клональность Т-клеток оценивали по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* методом ПЦР с последующим секвенированием фрагментов. Исследование клональности по генам *TCRG* и *TCRB* позволяет доказать наличие опухоли у большинства (97%) пациентов с ПТКЛ. Методом ПЦР показано поражение костного мозга и/или лейкокемия у большинства (93%) пациентов, тогда как морфологически поражение костного мозга подтверждено только у 73% пациентов. Множественные реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов γ и β , утрата и появление новых, присутствие нескольких опухолевых клонов обнаружено у 63% пациентов с ПТКЛ. Возможно, они связаны с генетической нестабильностью при ПТКЛ. Сделан вывод, что наличие множественных клональных реаранжировок *TCRG* и *TCRB* при ПТКЛ должно учитываться при использовании данного метода в диагностических целях. Клональная эволюция опухоли, появление новых клональных пиков (клонов) не свидетельствуют о появлении новой опухоли. Множественные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* при ПТКЛ затрудняют оценку минимальной остаточной болезни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА периферическая Т-клеточная лимфома, ПЦР, реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов, клональность Т-лимфоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПТКЛн – периферическая Т-клеточная лимфома, неуточненная; TCR – Т-клеточный рецептор; TCRG – Т-клеточный рецептор γ ; TCRB – Т-клеточный рецептор β ; TCRD – Т-клеточный рецептор δ ; CD – кластер дифференцировки.

ВВЕДЕНИЕ

Периферическая Т-клеточная лимфома, неуточненная (ПТКЛн) – гетерогенная группа лимфом с иммунофенотипом зрелых периферических (посттимических) Т-лимфоцитов. Данный диагноз охватывает более 29% Т-клеточных лимфом, которые не попадают под другие нозологические формы и является диагнозом исключения [1, 2]. Клинически заболевание протекает агрессивно (пятилетняя общая выживаемость не превышает 32%), часто носит распространенный (у 69% пациентов диагностируется стадия III/IV) и внеузловой характер, поражает костный мозг, кожу, подкожную клетчатку, легкие [3]. Считается, что морфологическим субстратом опу-

холи являются Т-лимфоциты, имеющие иммунофенотип зрелых Т-клеток с $\alpha\beta$ -вариантом Т-клеточного рецептора на поверхности (TCR $\alpha\beta$) и маркерами CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+ или CD8+, экспрессия которых несет признаки aberrантности (утрата одного или нескольких из них). ПТКЛн чаще имеет иммунофенотип CD4+/CD8-, реже CD4-/CD8+. В некоторых случаях у периферических Т-клеточных лимфом наблюдается очень скудная экспрессия Т-клеточных маркеров на поверхности, например только CD2 или CD3. Кроме того, небольшое число ПТКЛн – это лимфомы из $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, которые невозможно отнести по клинико-морфологическим данным к гепато-лиентальной

$\gamma\delta$ -лимфоме или $\gamma\delta$ -варианту лейкоза из больших гранулированных лимфоцитов [3–6]. Исследование клональных реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов при ПТКЛн позволяет в сложных диагностических случаях подтвердить Т-клеточную клональность и доказать наличие опухоли [7–11]. Суть метода состоит в ПЦР-амплификации и анализе области соединения V-D-J-сегментов генов Т-клеточных рецепторов δ (*TCRD*), γ (*TCRG*) и β (*TCRB*). В каждом нормальном Т-лимфоците данная область имеет уникальную нуклеотидную последовательность. При фрагментном анализе амплификатов, полученных из здоровой ткани, наблюдается множество пиков с Гауссовским распределением длин (рис. 1А). Моноклональные образцы, имеющие одинаковую длину ПЦР-продуктов, определяются

в виде одного пика (моноаллельная реаранжировка, рис. 1Б) или двух пиков (биаллельная реаранжировка, рис. 1В).

Длина моноклонального ПЦР-продукта уникальна для опухолевого клона и неизменна во всех пораженных тканях у данного пациента. Обнаружение клона, например, в пунктате костного мозга, будет указывать на поражение костного мозга. Кроме того, по характеру реаранжировок можно судить о степени зрелости лимфоидной опухоли. При созревании Т-лимфоцита в норме реаранжировки проходят последовательно: сначала перестраивается locus генов *TCRD* ($V\delta-D\delta$, $D\delta-D\delta$, $D\delta-J\delta$, $V\delta-J\delta$), затем *TCRG* ($V\gamma-J\gamma$) и неполностью *TCRB* ($D\beta-J\beta$). Несколько позже происходят полные реаранжировки *TCRB* ($V\beta-J\beta$) и α -locуса *TCR* ($V\alpha-J\alpha$) (рис. 2) [12, 13].

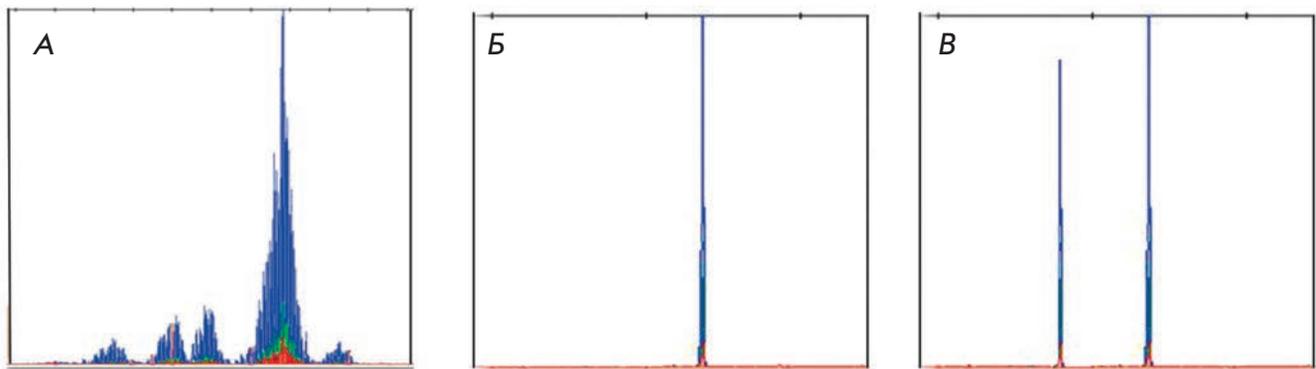


Рис. 1. Пример определения клональности по генам *TCRG*. А – поликлональный результат. Б – моноклональный результат (моноаллельная реаранжировка). В – моноклональный результат (биаллельная реаранжировка)

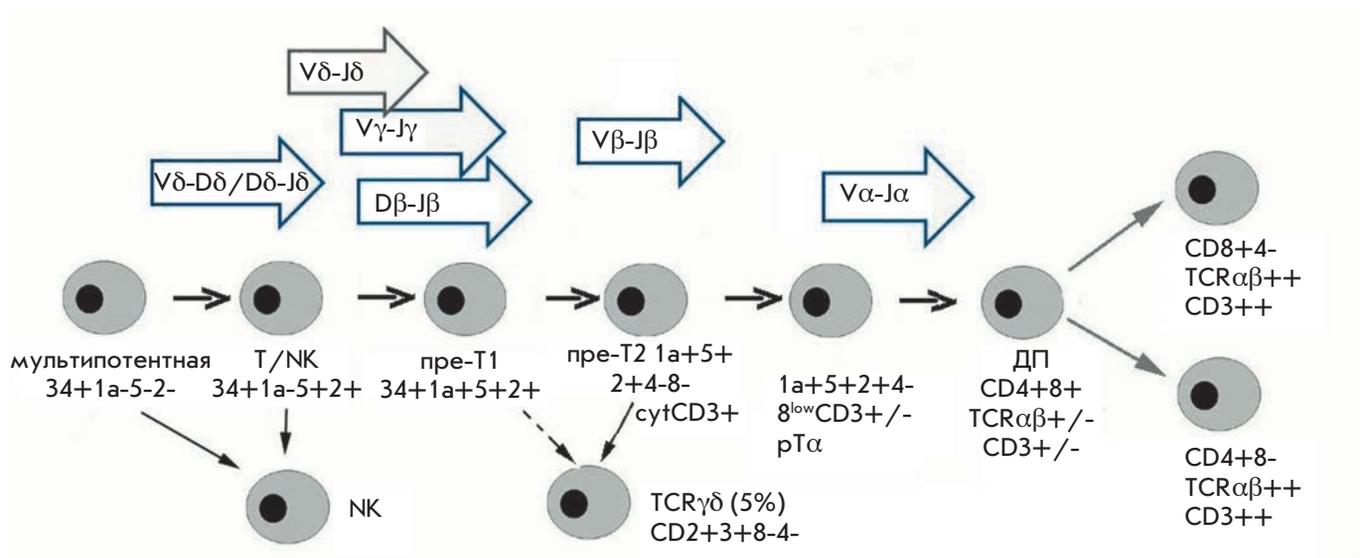


Рис. 2. Ранние стадии развития Т-лимфоцитов. Последовательные реаранжировки δ -, γ -, β - и α -цепей генов *TCR*. ДП – двойные позитивные клетки

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Таблица 1. Данные лабораторно-диагностических исследований

| № | Основные иммунофенотипические характеристики опухоли | Объем поражения | Стадия | КМ ПЦР | Общее кол-во клональных реаранжировок*** | | | Кол-во клонов** | Кол-во иссл. тканей |
|----|--|--------------------------------|--------|--------|--|------------|------------|-----------------|---------------------|
| | | | | | TCRG, TCRD* | TCRB Dβ-Jβ | TCRB Vβ-Jβ | | |
| 1 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30-GranzB-CD5-CD57-CXCL13-CD7+ | ЛУ | I | нм | 3 Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 0 | 2 | 1 |
| 2 | Сел CD3m+CD4+CD8+CD5+TIA-1+GranzB+CD7+CD56+ | КМ Печ Сел Киш | IV | + | 2 Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 1Vβ-Jβ | <u>3</u> | 5 |
| 3 | Сел CD3m+CD4-CD8+CD2+CD7+CD30-CD10-CD5+ | КМ Сел | IV | + | 1 Vγ-Jγ 3TCRD | 2 Dβ-Jβ | 5 Vβ-Jβ | <u>4</u> | 2 |
| 4 | КМ CD3m+CD4+CD8+CD10-CD1a-CD5+CD7+ | КМ Сел | IV | + | 6 Vγ-Jγ | 4 Dβ-Jβ | 5 Vβ-Jβ | <u>4</u> | 2 |
| 5 | КМ CD3e-CD4-CD8+(часть)CD7-CD2-CD1a-CD5-CD56-CD30-Сел CD3e+CD4-CD8-CD7-CD2-CD1a-CD5-CD30-ALK-GranzB- | КМ Сел | IV | + | 3 Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 3Vβ-Jβ | <u>3</u> | 3 |
| 6 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD45RO+CD2+CD7-CD30-ALK- | КМ ЛУ | IV | + | 3 Vγ-Jγ | нд | нд | 2 | 1 |
| 7 | ЛУ CD3m+CD4-CD8+CDRO+CD30-CD15-CD23-CD56- | КМ ЛУ Сел Жел | IV | + | 3 Vγ-Jγ | 1 Dβ-Jβ | 2Vβ-Jβ | <u>2</u> | 5 |
| 8 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD 5+CD10-CD23- | КМ ЛУ Кожя Минд | III | + | 5Vγ-Jγ | 1 Dβ-Jβ | 3Vβ-Jβ | <u>4</u> | 9 |
| 9 | ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD2+CD5+CD30+ | КМ ЛУ Кожя Горт Минд | IV | + | 8Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 3Vβ-Jβ | <u>7</u> | 6 |
| 10 | ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD5+TIA-1+ | КМ ЛУ Киш МЖ Легк | IV | + | 2Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 3Vβ-Jβ | <u>3</u> | 6 |
| 11 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD2+CD5+CD7+CD15-CD1a- | КМ ЛУ Легк Жел Кожя Печ Сел НЛ | III | + | 4Vγ-Jγ | 2 Dβ-Jβ | 2 Vβ-Jβ | <u>5</u> | 7 |
| 12 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30+GranzB-EMA+ | КМ ЛУ МЖ Легк Минд НЛ | IV | + | 3 Vγ-Jγ | 2 Dβ-Jβ | 1 Vβ-Jβ | <u>2</u> | 2 |
| 13 | Сел CD3m+CD4-CD8-TIA-I+ | КМ Сел Печ | IV | + | 8Vγ-Jγ | 2 Dβ-Jβ | 4Vβ-Jβ | <u>4</u> | 4 |
| 14 | ЛУ CD3m+CD4+CD8+CD7+CD2+CD30-NK- | КМ ЛУ Кожя | IV | + | 2 Vγ-Jγ | 3 Dβ-Jβ | 1 Vβ-Jβ | <u>2</u> | 2 |
| 15 | Сред CD3m+CD4+CD8-CD30-ALK- | Средостение | IE | нм | 2 Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 1 Vβ-Jβ | 1 | 1 |
| 16 | Легк CD3m+CD4+CD8-CD45RO+CD5+CD7+CD30-CD10-CD23- | ЛУ Легк | IE | + | 3Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 2Vβ-Jβ | <u>2</u> | 3 |
| 17 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30+CD33+CD56- | Сред ЛУ | III | + | 3Vγ-Jγ | 2Dβ-Jβ | 1Vβ-Jβ | <u>2</u> | 2 |
| 18 | ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD5+CD7+ | ЛУ | III | + | 2Vγ-Jγ | 0 | 2Vβ-Jβ | 1 | 2 |
| 19 | ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD5+CD4+CD10-ALK- | ЛУ Сел | III | + | 2Vγ-Jγ | 0 | 1Vβ-Jβ | 1 | 2 |
| 20 | Сел CD3c+CD4-CD8-CD1a-CD2+CD5-CD7-CD4-CD8-CD16+CD56+ | КМ Сел | IV | + | 2Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 2Vβ-Jβ | 2 | 2 |
| 21 | ЛУ CD3m+CD4-CD8-CD30-CD15-CD5+CD7+NK-CD2+GranzB- | КМ ЛУ | IV | + | 2Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 2Vβ-Jβ | <u>2</u> | 2 |
| 22 | ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD30-CD10-CD15-CD23- | КМ ЛУ | IV | + | 1Vγ-Jγ | 0 | 2Vβ-Jβ | 1 | 1 |
| 23 | Орбита CD3m+CD4+CD8+CD5+CD7+TIA-1+CD10-CD30-CD56-LPM-1-CD23-ALK- | Мягкие ткани орбиты | IE | нм | 1Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 1Vβ-Jβ | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|---------------|-----|---|-----------------|-------------------|------------------|---|---|
| 24 | Сел CD3m+CD4+CD8- CD2+CD5+CD7+CD56+TIA-1+ | КМ Сел | IV | + | 2Vγ-Jγ | 1Dβ-Jβ | 2Vβ-Jβ | 1 | 2 |
| 25 | ЛУ CD3m+CD4+CD8- CD2+CD7+GranzB+CD30-CXCL13- PD1-LMP1- | Сел ЛУ | III | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 26 | ЛУ CD3m+CD4+CD8- CD2+CD5+CD7+CD30-ALK- GranzB-EMA-CD56-CD57- | КМ ЛУ | IV | - | 0 | 2 Dβ-Jβ (сомн) | 1Vβ-Jβ (сомн) | 1 | 2 |
| 27 | ЛУ CD3e-CD4-CD8-CD10-CD5- CD23-CD30-ALK-ЛСА+CD2+CD7+ GranzB- | КМ ЛУ Кожа | IV | + | 0 | 1Dβ-Jβ (КМ) | 0 | 1 | 3 |
| 28 | КМ CD2+CD3+CD5-CD7+-CD4- CD8-CD16+56+cytCD3TCRγδ+ Сел CD3e+ (m+cyt) CD4-CD8-CD5- CD7-TIA-I+CD56+ | КМ Сел | IV | + | 2Vγ-Jγ 3TCRD | 2Dβ-Jβ | 0 | 1 | 2 |
| 29 | Кровь CD3+TCRαβ+CD4+CD8+CD5+CD7+ | КМ Сел | IV | + | 1Vγ-Jγ | 0 | 2Vβ-Jβ | 1 | 1 |
| 30 | КМ 30% клеток CD3+CD4-CD8- CD5-CD2+ | КМ Сел | IV | + | 3 Vγ-Jγ | 2Dβ-Jβ | 1Vβ-Jβ | 2 | 2 |

Примечание. ЛУ – лимфоузел, Сел – селезенка, КМ – костный мозг, Киш – кишечник, Жел – желудок, Горт – гортань, Печ – печень, Минд – миндалина, Легк – легкое, МЖ – молочные железы, НЛ – нейролейкемия, Сред – средостение. *TCRD** – исследование генов *TCRD* проведено у двух пациентов с подозрением на γδ-Т-клеточную лимфому. Кол-во клонов** – минимальное количество опухолевых клонов у пациента, которое оценивалось по количеству клональных реаранжировок в одном локусе и по появлению (смене) клональных продуктов в различных тканях. Случаи, где зафиксировано появление (смена) клональных продуктов, подчеркнуты. Объяснение см. в разделе Результаты и обсуждение. Общее кол-во клональных реаранжировок*** – совокупное количество клональных реаранжировок (пиков), обнаруженное во всех исследованных тканях. нм – нет материала, нд – нет данных, сомн – сомнительная картина.

Так как гены *TCRδ* (*TCRD*) располагаются внутри локуса *TCRα*, то они вырезаются при реаранжировках *TCRα*. Таким образом, спектр наблюдаемых при лимфомах клональных реаранжировок можно разделить на ранние и более зрелые. Если в опухоли обнаруживают клональные продукты локусов *TCRD*, *TCRG*, неполные перестройки Dβ-Jβ, и не находят полных Vβ-Jβ-реаранжировок генов *TCRB*, то это говорит о раннем характере реаранжировок, что соответствует опухоли из γδ-Т-лимфоцитов. Чаще в опухоли представлен более зрелый спектр реаранжировок: одновременно присутствуют реаранжировки Vγ-Jγ, Dβ-Jβ и Vβ-Jβ, что характерно для большинства *TCRαβ*-лимфом, в том числе и ПТКЛ. Согласно опубликованным данным, клональные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* имеют 81–94% и 96% ПТКЛн соответственно [7, 8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В Гематологическом научном центре Минздрава России (далее ГНЦ) проведен ретроспективный анализ результатов исследования клональности при ПТКЛн за последние 10 лет (2005–2015 гг.).

Пациенты и образцы

Выборка больных состояла из 30 человек (15 мужчин и 15 женщин, медиана возраста 56 лет (32–75)).

Стадию заболевания определяли согласно классификации Ann-Arbor (1971), поражение костного мозга считали IV стадией. У четырех пациентов диагностирована стадия I, у четырех – III, у 22 – IV. Поражение лимфатических узлов отмечено у 18 (60%) пациентов, костного мозга у 22 (73%), селезенки у 14 (47%), кожи у 5 (17%), желудочно-кишечного тракта у 4 (13%), легких у 4 (13%), миндалин у 3 (10%), печени у 3 (10%), средостения у 2 (7%), оболочек головного мозга (нейролейкемия) у 2 (7%), молочных желез у 2 (7%), мягких тканей орбиты у 1 (3%) (табл. 1). Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнены в патолого-анатомическом отделении ГНЦ, молекулярно-генетические исследования клональности – в лаборатории молекулярной гематологии ГНЦ.

Выделение ДНК из тканей

Лейкоциты и ДНК из крови и костного мозга выделяли как описано ранее [14]. Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, брали пять срезов по 5 мкм в пробирки Eppendorf. Ткань депарафинизировали методом нагревания [15, 16]. Свежезамороженную ткань для выделения ДНК размораживали и вырезали кусочек 1 × 1 × 1 мм. ДНК выделяли методом, основанным на растворении ткани в концентрированном аммиаке, с последующей

Таблица 2. Наборы ПЦР-праймеров по протоколу BIOMED-2 для генов *TCRD*, *TCRG*, *TCRB*

| Набор праймеров (название пробирок) | Прямые праймеры | Обратные праймеры | Длина продуктов, п.н. |
|--|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>TCRD</i> Tube A | Dδ2, Vδ1, Vδ2, Vδ3, Vδ4, Vδ5, Vδ6 | Jδ1FAM Jδ2R6G Jδ3TAMRA Jδ4ROX | 130–280 |
| <i>TCRD</i> Tube B | Dδ2, Vδ1, Vδ2, Vδ3, Vδ4, Vδ5, Vδ6 | Dδ3FAM | 190–280 |
| <i>TCRG</i> | Vγ1f, Vγ9, Vγ10, Vγ11 | Jγ1/2FAM Jγ1/2FAM | 100–250 |
| <i>TCRB</i> Tube A | Vβ2–Vβ24 (23 праймера) | Jβ1.1–Jβ1.6HEX (6 праймеров) Jβ2.2, Jβ2.6, Jβ2.7 FAM (3 праймера) | 240–280 |
| <i>TCRB</i> Tube B | Vβ2–Vβ24 (23 праймера) | Jβ2.1, Jβ2.3, Jβ2.4, Jβ2.5 FAM (4 праймера) | 240–280 |
| <i>TCRB</i> Tube C | Dβ1, Dβ2 | Jβ1.1–Jβ1.6HEX Jβ2.1–Jβ2.7FAM (13 праймеров) | 170–210 (Dβ2) 290–310 (Dβ1) |

нейтрализацией ледяной уксусной кислотой и высаливанием белков [17]. Концентрацию ДНК определяли на УФ-спектрофотометре. Образцы ДНК хранили при -20°C .

Исследование реаранжировок генов TCR при помощи ПЦР и фрагментного анализа

T-клеточную клональность оценивали с использованием мультиплексных систем праймеров BIOMED-2 для фрагментного анализа [13] по перестройкам генов *TCRG* (Vγ–Jγ), *TCRB* (Vβ–Jβ, Dβ–Jβ). При γδ-T-клеточных лимфомах анализировали также перестройки генов *TCRD*. Мультиплексную амплификацию генов *TCRD*, согласно протоколу BIOMED-2, проводили в двух пробирках – Tube A и Tube B, а амплификацию генов *TCRB* в трех пробирках – Tube A, Tube B и Tube C (описание реакций см. в табл. 2). Для амплификации генов *TCRD*, *TCRG* использовали праймеры производства «Синтол», Россия. Реакционная смесь в конечном объеме 20 мкл включала: 100 нг ДНК, 10 мкл 2 × смеси для ПЦР (PCR Master Mix Promega), 5 пмоль каждого праймера. Гены *TCRB* амплифицировали с использованием коммерческого набора *TCRB Gene Clonality Assay* ABI Fluorescence Detection (Invivoscribe Technologies) и ДНК-полимеразу *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems) в соответствии с инструкцией производителя. Условия ПЦР: предварительная денатурация 95°C (5 мин); 35 циклов – 92°C (35 с), 60°C (35 с), 72°C (35 с); окончательная элонгация – 72°C (10 мин). ПЦР проводили на автоматическом термоциклере *DNA Engine* (BioRad, Hercules, США).

Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеи-

новых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для этого 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл формамида (Applied Biosystems) и 0.04 мкл *GeneScan 500-LIS Size Standard* (Applied Biosystems). После денатурации при 95°C в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси вносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems). Флуоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) анализировали при помощи компьютерной программы *GeneMapper v. 4.0* (Applied Biosystems).

Статистический анализ

Для сравнения результатов, полученных двумя методами, вычисляли критерий ранговой корреляции Спирмена по формуле: $r_s = 1 - 6 \sum d^2 / (N^3 - N)$, где N – число членов совокупности, d – разность рангов для каждого члена выборки, r_s – коэффициент Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клональность генов *TCR* выявлена у 29 из 30 пациентов (97%): по генам *TCRG* – у 27 из 30 (90%), по генам *TCRB* – у 29 из 30 (97%). В некоторых образцах ПТКЛ реаранжировка обнаружена только в одном из локусов – *TCRG* или *TCRB*, что обусловлено аномальной дифференцировкой опухолевых клеток и часто сочетается с незрелым и aberrантным иммунофенотипом. Например, у опухолевых клеток пациента № 27, в костном мозге которого найдена лишь одна клональная реаранжировка Dβ–Jβ, на поверхности не найдены CD3, CD5, CD4 или CD8, а об-

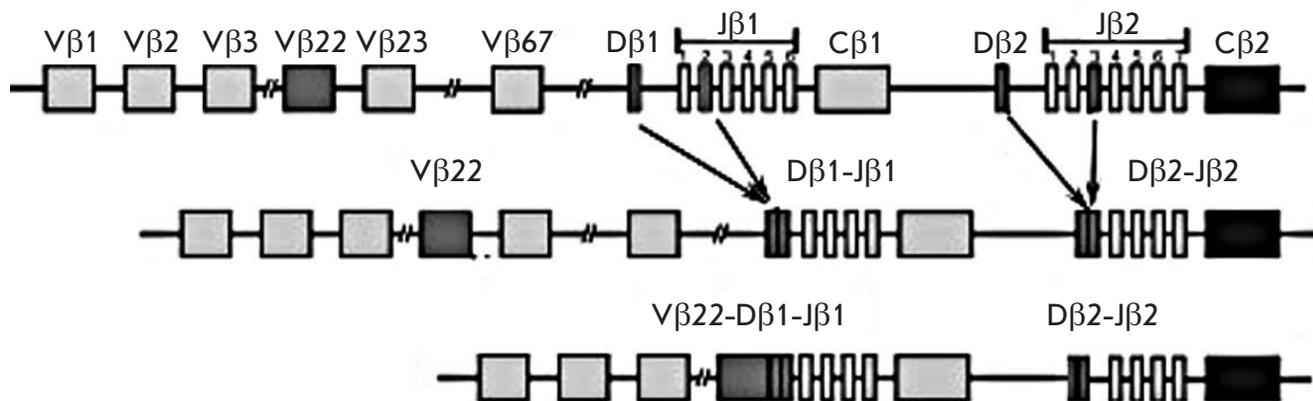


Рис. 3. Пример появления дополнительной реаранжировки Dβ2–Jβ. Представлена схема локуса TCRB с двумя реаранжировками Vβ22–Dβ1–Jβ1 и Dβ2–Jβ2

наружены только CD2 и CD7. Наиболее вероятная причина отсутствия клональных пиков при исследовании генов TCR (пациент № 25) – малое количество опухолевых клеток в образце (много реактивных Т-лимфоцитов). Методом ПЦР поражение костного мозга или лейкемизация (присутствие клональных лимфоцитов в крови) обнаружено у 93% (у 25 из 27) пациентов (табл. 1). При этом клональные реаранжировки в костном мозге не обнаружены только у пациентов № 25 и № 26, у которых клональные пики также отсутствовали или были сомнительными в лимфоузлах. У четырех пациентов (№ 16–19) морфологическими методами поражение костного мозга не выявлено, тогда как методом ПЦР клональные клетки выявлены в костном мозге. Обнаружение клональных реаранжировок генов TCRG в костном мозге или крови считается плохим прогностическим фактором при ПТКЛ [18]. У большинства пациентов мы наблюдали множественные (более двух) клональные реаранжировки в одном локусе. Клон опухолевых лимфоцитов может иметь реаранжировку на одной хромосоме (моноаллельная реаранжировка) или на двух гомологичных хромосомах (биаллельная реаранжировка). Таким образом, для каждого гена (TCRD или TCRG, или TCRB) в одном опухолевом клоне мы можем обнаружить только один или два клональных пика.

В качестве исключения описано появление дополнительной реаранжировки Dβ2–Jβ (рис. 3) [19, 20]. В этом случае при фрагментном анализе мы наблюдаем появление дополнительного клонального пика в диапазоне 170–210 п.н. в пробирке С (Tube С, см. табл. 2) при амплификации генов TCRB.

У 13 из 30 (43%) пациентов, хотя бы в одной ткани обнаружены три и более клональных пика в одном

локусе генов TCR (у 10 пациентов в локусе TCRG, у 11 – в локусе генов TCRB). При этом множественные (три и более) клональные пики с одинаковой частотой обнаруживались в костном мозге, лимфоузлах и/или селезенке (у 10 из 13 пациентов). Теоретически «лишние» пики можно было бы отнести на счет реактивных Т-клеток, однако мы столкнулись с совершенно иной ситуацией. У 63% пациентов (15 из 24), у которых анализировали несколько тканей, мы наблюдали появление новых клональных пиков и соответственно новых клонов в различных тканях. Зафиксированные ранее клональные реаранжировки либо не определялись, либо частично сохранялись. При этом картина по генам TCRG и TCRB совпадала, т.е. обнаружение нового клонального пика по генам TCRG обычно сопровождалось выявлением новой клональной реаранжировки генов TCRB. Такую картину можно объяснить только присутствием нескольких опухолевых клонов и различным их представительством в тканях и органах. В общей сложности у 19 из 30 пациентов (63%) мы обнаружили несколько клонов. Число клонов варьировало от двух до семи (табл. 1). Корреляции с возрастом ($p = 0.43$) и стадией заболевания ($p = 0.29$) не обнаружено. Выявление нескольких клонов коррелировало с количеством проанализированных тканей ($r_s = 0.6$, $p < 0.0005$). Возможно, данный феномен не был обнаружен у других пациентов лишь из-за малого количества изученных тканей. Ниже приведены наиболее репрезентативные примеры исследования клональности при ПТКЛ.

Пациент 11 (рис. 4). При постановке диагноза у пациента 11 выявлена типичная для зрелой Т-клеточной лимфомы картина: биаллельная реаранжировка генов TCRG (212 и 224 п.н.) и полная ре-

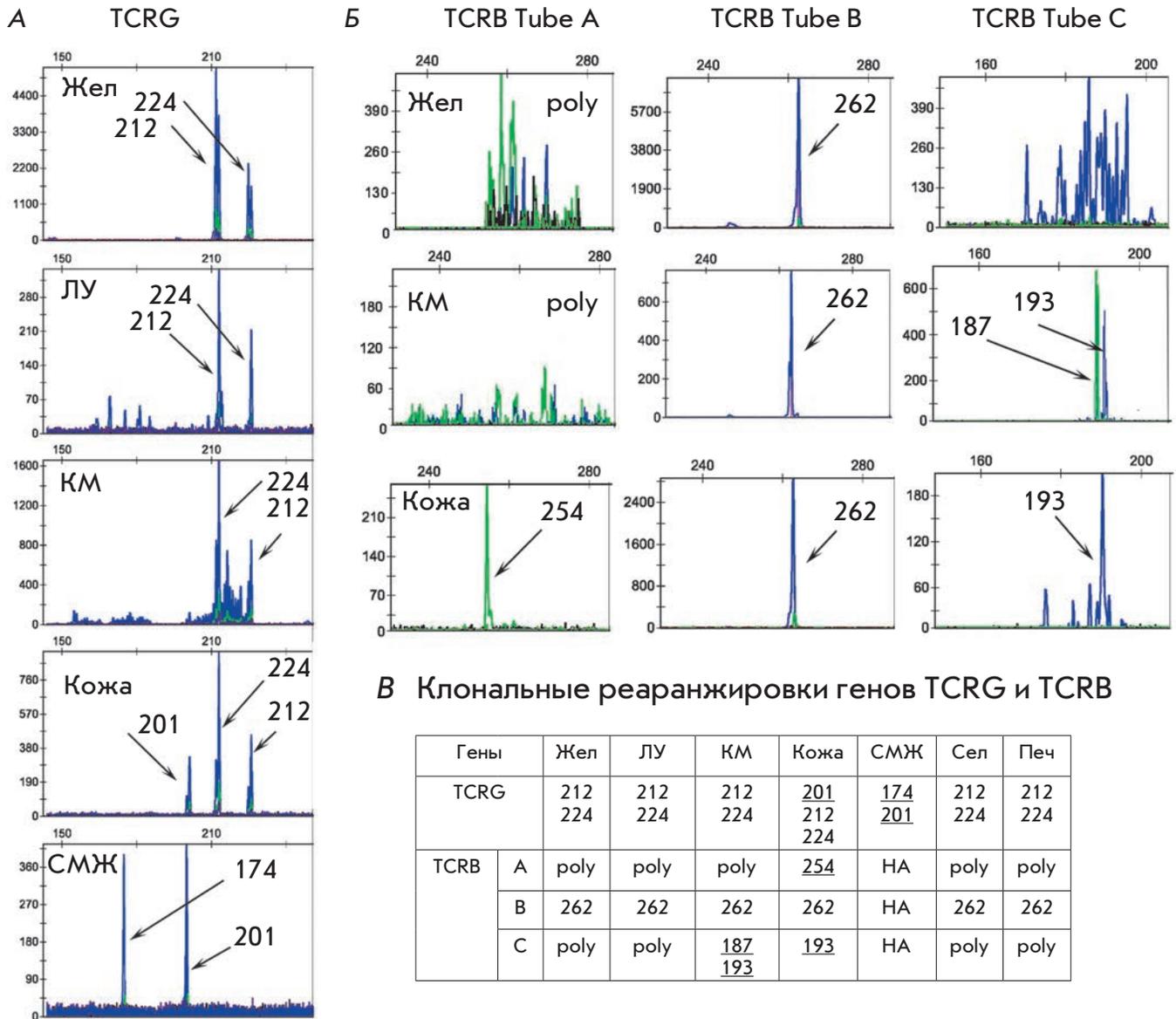


Рис. 4. Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 11. А – исследование генов *TCRG*. Б – исследование генов *TCRB*. В – общая таблица. Жел – желудок, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, СМЖ – спинномозговая жидкость, poly – поликлональный результат, НА – нет амплификации. Новые клональные продукты подчеркнуты

аранжировка генов *TCRB* (Tube B 262 п.н.). При исследовании костного мозга выявлено еще два клона с неполными реаранжировками генов *TCRB* (Tube C 187 и 193 п.н.). Прогрессия заболевания приводит к поражению кожи, при котором обнаружены один или два новых клона с реаранжировкой генов *TCRG* (201 п.н.) и полной реаранжировкой генов *TCRB* (Tube A 254 п.н.). Дальнейшая прогрессия приводит к развитию нейрорлейкемии. В спинномозговой жидкости (СМЖ) отсутствуют клоны, обнаруженные в опухоли ранее (*TCRG* 212 и 224 п.н.), но найден клон с реаранжировкой генов *TCRG* длиной 201 п.н. и новый

клон с реаранжировкой генов *TCRG* длиной 174 п.н. Через 11 месяцев в связи с нарастающей цитопенией пациенту проведена спленэктомия и биопсия печени. В селезенке и печени картина клональных реаранжировок совпадает с первоначальной картиной в лимфоузле и желудке. Таким образом, у пациента 11 в общей сложности выявлены четыре реаранжировки генов *TCRG*: две полные реаранжировки генов *TCRB* и две неполные реаранжировки генов *TCRB*. Динамика появления новых реаранжировок в ходе прогрессии заболевания свидетельствует о пяти или более различных опухолевых клонах.

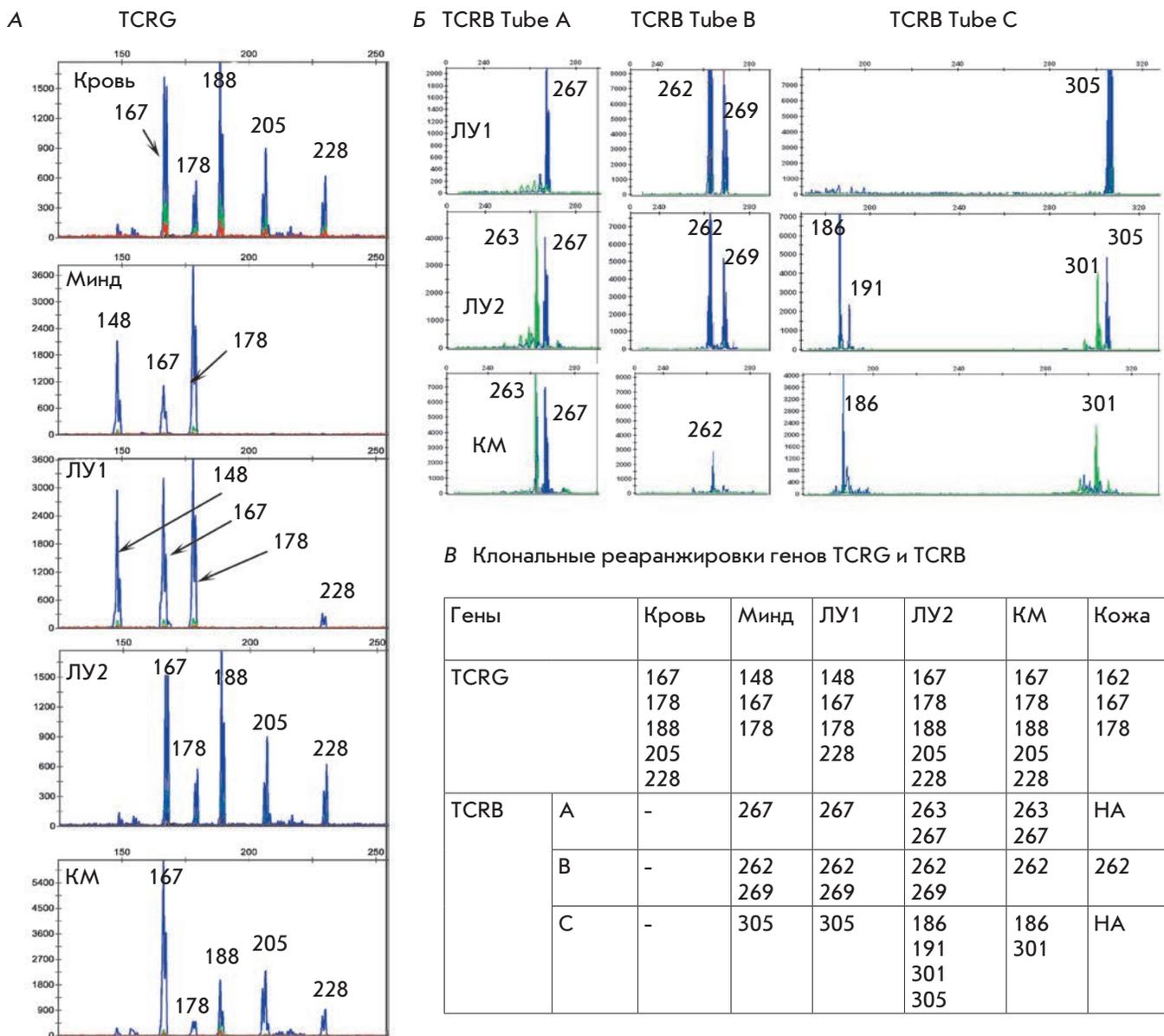


Рис. 5. Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 9. А – исследование генов TCRG. Б – исследование генов TCRB. В – общая таблица. Минд – миндалина, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, НА – нет амплификации

Пациент 9 (рис. 5). У пациента 9 выявлены множественные клональные реаранжировки генов TCRG и TCRB с различным представительством клонов в тканях и органах. При первичной диагностике исследовали кровь, костный мозг, биоптат миндалины и лимфоузла № 1. В крови и костном мозге выявлено пять и более реаранжировок генов TCRG и TCRB. В миндалине и лимфоузле № 1 найдены три и четыре клональных реаранжировки TCRG соответственно, и четыре реаранжировки генов TCRB. При прогрессии заболевания выполнена

биопсия лимфоузла № 2 и кожи. В биоптате лимфоузла найдено пять реаранжировок генов TCRG и восемь – TCRB. За исключением реаранжировки генов TCRB (А) 267 п.н. и генов TCRB (В) 262 п.н., которые в большинстве тканей присутствуют одновременно, остальные реаранжировки генов TCRB распределены произвольно и относятся к различным опухолевым клонам. Данные молекулярного исследования клональности свидетельствуют о наличии у данного пациента семи или более опухолевых клонов.

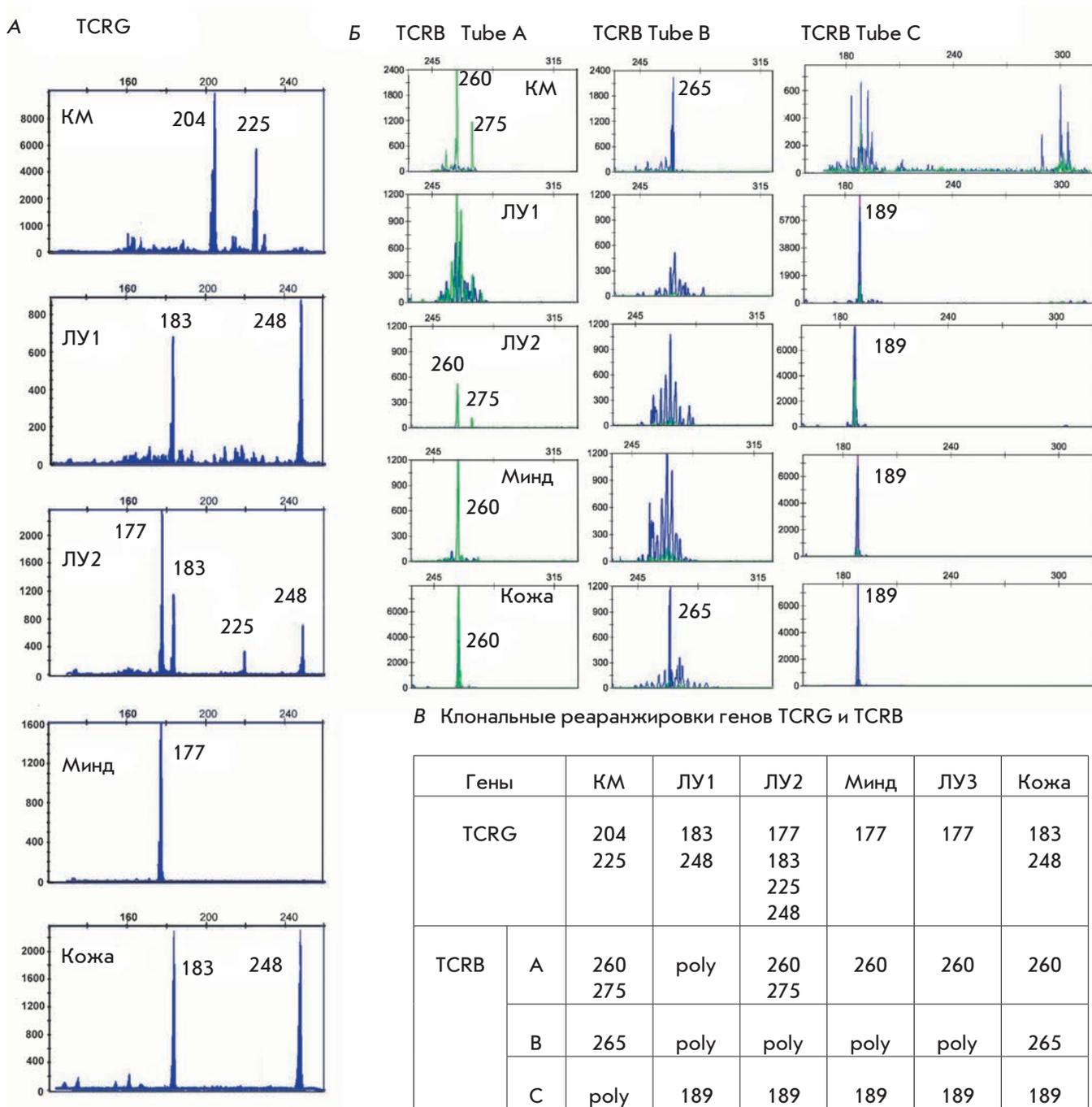


Рис. 6. Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 8. А – исследование генов TCRG. Б – исследование генов TCRB. В – общая таблица. Минд – миндалина, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, poly – поликлональный результат

Пациент 8 (рис. 6). У пациента 8 выявлено пять различных реаранжировок TCRG (177, 183, 204, 225, 248 п.н.), при этом в исследованных тканях представлены разные клоны. Найдено четыре реаранжировки генов TCRB: три полные реаранжировки (Tube A и B) и одна неполная Dβ2–Jβ2 (Tube C). В данном случае

нет четкой связи между картиной реаранжировок генов TCRG и TCRB. Например, в лимфоузле № 1 и коже доминируют реаранжировки генов TCRG 183 и 248 п.н., однако в случае генов TCRB картина различается. Количество клонов у данного пациента – четыре или более, однако не исключено, что клонов

может быть гораздо больше. Например, клоны только с реаранжировкой *TCRG* или *TCRB*, или клоны с реаранжировкой генов *TCRG* 177 п.н. и *TCRB* 260 п.н., *TCRG* 177 п.н. и *TCRB* 189 п.н. и т.д.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие нескольких опухолевых клонов, описанное при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ), объясняется «текущим» незавершенным процессом реаранжировок генов иммуноглобулинов и *TCR* в ранних клетках-предшественниках [21–24]. Секвенирование клональных продуктов при манифестации ОЛЛ и в рецидиве показало, что при ОЛЛ одновременно присутствуют клоны с незавершенной реаранжировкой генов *TCRD* или *TCRB* и производные от них клоны с завершенными реаранжировками. Кроме того, в ряде случаев происходит изменение завершенной реаранжировки. Ген *V* заменяется другим (вышележащим) либо реаранжировка полностью заменяется на другую из вышележащих генов *V* и нижележащих *J*, т.е. генов, которые находятся дистальной предыдущей реаранжировки. Иногда в рецидиве наблюдается делеция и исчезновение клональной реаранжировки генов *TCR*.

Мы предполагаем, что молекулярные события, происходящие при ОЛЛ, могут иметь место и при ПТКЛ. В опухолевой клетке нарушены механизмы контроля, которые при наличии продуктивной реаранжировки останавливают дальнейшие перестройки локуса: повышена активность ферментов *RAG1* и *RAG2*, изменена организация хроматина и т.д. Вероятно, при ПТКЛ реаранжировки могут заменяться новыми и/или возможна замена незавершенных *D β -J β* на завершенные *V β -J β* . Кроме того, наблюдается общая хромосомная нестабильность, которая может приводить к делециям или дублика-

циям локуса генов *TCR*. Делеция локуса, вероятно, запускает механизм дальнейших реаранжировок на гомологичной хромосоме. Комплексные хромосомные изменения, в том числе триплоидия, тетраплоидия, потери хромосом, трисомия 7q, транслокации с участием локусов генов *TCR* (14q11, 7q34–35, 7p13–21), описаны при различных периферических Т-клеточных лимфомах [25–27]. В любом случае клональные реаранжировки – это лишь маркер, который показывает гетерогенность данной опухоли и клональную эволюцию при прогрессии заболевания. У большинства пациентов нами выявлена «многоклоновость», однако пока неясно, присущ ли данный феномен только ПТКЛ. Возможно, некоторые другие лимфомы также обладают значительной клональной гетерогенностью, но для их «визуализации» требуются другие подходы и методы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение клональности по генам *TCRG* и *TCRB* позволяет эффективно доказывать присутствие опухоли у большинства (97%) пациентов с ПТКЛ. Методом ПЦР показано поражение костного мозга и/или лейкокемия у большинства (93%) обследованных, тогда как морфологически поражение костного мозга подтверждено только у 73% пациентов. Специфическая картина реаранжировок при ПТКЛ (множественные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB*, утрата и появление новых, присутствие нескольких опухолевых клонов) наблюдалась у большей части пациентов (63%) и безусловно должна учитываться при использовании данного метода в диагностических целях. Появление новых клональных пиков (клонов) не должно расцениваться как появление новой опухоли. Кроме того, множественные реаранжировки крайне затрудняют оценку минимальной остаточной болезни при ПТКЛ. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC, 2008. V. 2. 439 p.
2. Vose J., Armitage J., Weisenburger D., Savage K., Connors J., Gascoyne R., Chhanabhai M., Wilson W., Jaffe E., Armitage J., et al. // J. Clin. Oncol. 2008. V. 26. № 25. P. 4124–4130.
3. Weisenburger D.D., Savage K.J., Harris N.L., Gascoyne R.D., Jaffe E.S., MacLennan K.A., Rüdiger T., Pileri S., Nakamura S., Nathwani B., et al. // Blood. 2011. V. 117. № 12. P. 3402–3408.
4. de Leval L., Gaulard P. // Histopathology. 2011. V. 58. № 1. P. 49–68.
5. Виноградова Ю.Е., Луценко И.Н., Самойлова Р.С., Селиванова Е.И., Замулаева И.А., Грецов Е.М., Воробьев И.А., Капланская И.Б., Рыжикова Н.А., Аль-Ради Л.С. и др. // Гематология и трансфузиология. 2009. Т. 54. № 2. С. 14–18.
6. Vinogradova Y.E., Kaplanskaya I.B., Samoilova R.S., Vorobiev I.A., Zingerman B.V., Sidorova Y.V., Shklovskiy-Kordi N.E., Aitova L.G., Maryin D.C., Vorobiev A.I., et al. // Clin. Med. Insights: Blood Disorders. 2012. № 5. P. 1–13.
7. Brüggemann M., White H., Gaulard P., Garcia-Sanz R., Gameiro P., Oeschger S., Jasani B., Ott M., Delsol G., Orfao A., et al. // Leukemia. 2007. V. 21. № 2. P. 215–221.
8. Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A. // J. Mol. Diagn. 2006. V. 8. № 4. P. 466–475.
9. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Пекло М., Власик Т.Н., Самойлова Р.С., Кравченко С.К., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Е., Пивник А.В., Судариков А.Б. // Терапевт. архив. 2003. Т. 75. № 7. С. 48–52.
10. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Бидерман Б.В., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Э., Аль-Ради Л.С., Судариков А.Б. // Терапевт. архив. 2006. Т. 78. № 7. С. 52–57.
11. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Бидерман Б.В., Грознова

- А.А., Сорокина Т.В., Судариков А.Б. // Справочник заведующего КДЛ. 2009. № 6. P. 13–21.
12. Rothenberg E.V., Moore J.E., Yui M.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. № 1. P. 9–21.
13. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuur- ing E., García-Sanz R., et al. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
14. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисиличина Д.Г., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Лугов- ская С.А., Иванова В.Л., Ковалева Л.Г., и др. // *Клин. лаб. диагностика.* 2011. № 12. С. 22–35.
15. Wu L., Patten N., Yamashiro C.T., Chui B. // *Appl. Immuno- histochem. Mol. Morphol.* 2002. V. 10. № 3. P. 269–274.
16. Coombs N.J., Gough A.C., Primrose J.N. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 16. e12.
17. Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. // *Exp. Dermatol.* 2012. V. 21. № 1. P. 57–60.
18. Schützinger C., Esterbauer H., Hron G. // *Leuk. Lymphoma.* 2008. V. 49. № 2. P. 237–246.
19. Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L.M., Van Dongen J.J.M. // *Leukemia.* 1999. V. 13. № 6. P. 965–974.
20. Groenen P.J., Langerak A.W., van Dongen J.J., van Krieken J.H. // *J. Hematop.* 2008. V. 1. № 2. P. 97–109.
21. Szczepański T., van der Velden V.H., Raff T., Jacobs D.C., van Wering E.R., Brüggemann M., Kneba M., van Dongen J.J. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 11. P. 2149–2156.
22. de Haas V., Verhagen O.J., von dem Borne A.E., Kroes W., van den Berg H., van der Schoot C.E. // *Leukemia.* 2001. V. 15. № 1. P. 134–140.
23. Szczepański T., Willemsse M.J., Brinkhof B., van Wering E.R., van der Burg M., van Dongen J.J. // *Blood.* 2002. V. 99. № 7. P. 2315–2323.
24. Germano G., del Giudice L., Palatron S., Giarin E., Cazza- niga G., Biondi A., Basso G. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 8. P. 1573–1582.
25. Boehm T., Rabbitts T.H. // *FASEB J.* 1989. V. 3. № 12. P. 2344–2359.
26. Schlegelberger B., Himmler A., Godde E., Grote W., Feller A.C., Lennert K. // *Blood.* 1994. V. 83. № 2. P. 505–511.
27. Gesk S., Martín-Subero J.I., Harder L., Luhmann B., Schlegelberger B., Calasanz M.J., Grote W., Siebert R. // *Leu- kemia.* 2003. V. 17. № 4. P. 738–745.

УДК 577.29

Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека

О. Н. Шилова*, Г. М. Прошкина, Е. Н. Лебедеико, С. М. Деев

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

*E-mail: olga.shilova.n@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2015

РЕФЕРАТ Разработка и исследование новых высокоаффинных белковых соединений, способных избирательно и эффективно уничтожать раковые клетки человека, являются актуальной задачей современных биомедицинских исследований. В работе изучена способность рекомбинантного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG взаимодействовать с клетками аденокарциномы молочной железы человека, гиперэкспрессирующими рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). Установлено, что адресный фототоксин DARPIn-miniSOG специфически взаимодействует с рецептором HER2 и вызывает его интернализацию, за которой следует медленный возврат рецептора на клеточную мембрану. Выяснение характера взаимодействия белка DARPIn-miniSOG с рецептором является важным условием для дальнейшей разработки методов воздействия на HER2-положительные опухоли с использованием данного фототоксина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресные фототоксичные белки, интернализация, каркасные белки, рециркуляция, рецептор HER2, DARPIn.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; PBS – фосфатно-солевой буфер; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антител; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); IPTG – изопропилтио-β-D-галактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела и их производные широко используются в биомедицинской практике для селективного, прицельного поражения опухолевых новообразований человека [1, 2]. Вместе с тем, успехи в разработке методов получения неприродных белков, высокоаффинных к специфическим мишеням (создание синтетических библиотек, разработка эффективных технологий отбора белков, высокоаффинных к специфической мишени), позволили создать новые, так называемые каркасные белки (скаффолды) неиммуноглобулиновой природы с единым основным каркасом и возможностью варьировать специфичность по отношению к мишени [3–5]. Зачастую каркасные белки, обладая такой же высокой аффинностью и специфичностью к мишени, как соответствующие моноклональные антитела, превосходят их по своим физико-химическим свойствам.

Так, для каркасных белков характерно отсутствие агрегации, небольшой размер, обеспечивающий эффективное проникновение в ткани, быстрый фолдинг и высокая химическая, протеолитическая и термическая стабильность. Возможность получения нужного каркасного белка с единственным остатком цистеина в его составе облегчает последующую конъюгацию с цитотоксинами, флуорофорами или наночастицами, а отсутствие дисульфидных связей позволяет экспрессировать эти белки в цитоплазме *Escherichia coli* и нарабатывать белки, высокоаффинные к конкретной мишени, без иммунизации животных. Перечисленные особенности дают каркасным белкам неоспоримые преимущества перед иммуноглобулинами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для диагностики и терапии различных заболеваний.

К каркасным белкам, представляющим альтернативу моноклональным антителам, относятся аднектины, аффибоды, антикалины, а также искусственные белки, сконструированные на основе природных белков с повторяющимися структурными мотивами (анкириновые и тетратрикопептидные повторы) [3–5].

В лаборатории А. Плюктуна на основе искусственных белков с анкириновыми повторами – DARPin (Designed Ankyrin Repeat Proteins), получен ряд белков, обладающих высокой аффинностью к рецептору 2 эпидермального фактора роста человека HER2 (ERBB2) [6].

Поверхностный клеточный рецептор HER2 сверхэкспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников [7, 8]. Как правило, сверхэкспрессия этого рецептора коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли и активным метастазированием [9], что делает его привлекательной мишенью для иммунотерапии рака, поскольку в норме HER2 экспрессируется лишь в небольших количествах на поверхности эпителиальных клеток. Таким образом, создание и исследование новых высокоаффинных белковых соединений, способных избирательно и эффективно уничтожать раковые клетки, сверхэкспрессирующие HER2, остаются актуальной задачей.

В своей работе мы использовали DARPin₉₋₂₉ в качестве адресного домена, способного доставить к HER2-положительным клеткам аденокарциномы молочной железы человека фототоксический белок miniSOG [10].

Цель данного исследования состояла в изучении способности гибридного белка DARPin-miniSOG взаимодействовать с опухолевыми клетками, сверхэкспрессирующими HER2, и возможности интернализации образующегося комплекса HER2/DARPin-miniSOG.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия культивирования

Культивируемые клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующие HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO растили в среде McCoy's 5A (Life technologies, США) с 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (HyClone, Бельгия) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Получение белка DARPin-miniSOG

Кодирующую последовательность адресного модуля DARPin₉₋₂₉ амплифицировали с плазмиды pCG-Hnse-DARPin-d18-9-29 (любезно предоставлена А. Плюктуном, Университет Цюриха). ПЦР-

фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII и лигировали с вектором pET22b, предварительно обработанным этими же эндонуклеазами рестрикции. Кодирующую последовательность цитотоксического модуля miniSOG амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-miniSOG [11], обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и XhoI и клонировали в вектор pET22b в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью DARPin₉₋₂₉. В результате экспрессионная кассета содержала индуцибельный промотор фага T7, последовательности, кодирующие DARPin₉₋₂₉, miniSOG и олигогистидиновый пептид.

Белок DARPin-miniSOG экспрессировали в штамме BL21(DE3). Экспрессию индуцировали 1 mM IPTG при достижении культурой OD₆₀₀ = 0.5–0.7. После индукции биомассу растили при 25°C в течение 8 ч. Белок DARPin-miniSOG выделяли из растворимой фракции с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии согласно протоколу производителя.

Проточная цитофлуориметрия

Опыты по проточной цитофлуориметрии выполняли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США). Адгезивные клетки снимали с подложки раствором Версена («ПанЭко», Россия) и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, «ПанЭко», Россия). Для определения субпопуляций живых и мертвых клеток пробу инкубировали в 100 мкл PBS с йодидом пропидия (конечная концентрация 2.5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в темноте на льду в течение 5 мин. Для каждого образца собирали не менее 10⁴ событий. При измерении последовательно выделяли популяции одиночных клеток, затем живых клеток (не окрашенных йодидом пропидия). Для детекции использовали следующие параметры: напряжение на лазере 20 мВт и фильтры 533/30 (FL1-канал) для детекции флуоресценции DARPin-miniSOG, 585/40 (FL2-канал) для детекции флуоресценции йодида пропидия. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6.

Конкурентный анализ

Специфичность связывания рекомбинантного белка DARPin-miniSOG с клеточным рецептором HER2 определяли по уровню флуоресценции HER2-сверхэкспрессирующих клеток, окрашенных белком DARPin-miniSOG, с помощью проточной цитофлуориметрии в отсутствие и в присутствии конкурирующего агента. Клетки линии SK-BR-3, достигшие конfluence, снимали с подложки раствором Версена, промывали дважды PBS. На один опыт

брали $\sim 10^5$ клеток. Клетки инкубировали с белком DARPIn-miniSOG (500 нМ) на льду в течение 30 мин, затем дважды отмывали раствором PBS от несвязавшегося белка и анализировали уровень флуоресценции в канале FL1 (зеленая флуоресценция). В качестве параметра интенсивности флуоресценции в работе использовали среднее значение интенсивности флуоресценции Mean FL1. В качестве конкурирующего агента использовали DARPIn_9-29 в эквивалентной концентрации. В качестве отрицательного контроля использовали анти-HER2-мини-антитело 4D5scFv, специфичное к другому эпитопу HER2.

Оценка интернализации HER2 при взаимодействии с DARPIn-miniSOG

Клетки SK-BR-3 выращивали в течение 14 ч на среде McCoy's 5A (Life technologies, США), содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия). Культуральную среду удаляли, клетки снимали с пластика и дважды промывали стерильным PBS. Суспензию клеток в количестве 4×10^5 в течение 30 мин инкубировали на льду в 250 мкл 1 мкМ раствора DARPIn-miniSOG в PBS, осаждали центрифугированием на охлажденной центрифуге в течение 5 мин при 800g, однократно промывали холодным PBS и делили на четыре части. Первую из них использовали для измерения уровня флуоресценции клеток, окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C. Для контроля уровня базовой аутофлуоресценции клеток использовали клетки, не инкубированные с белком DARPIn-miniSOG.

Остальные три части суспензии клеток (по 1×10^5 клеток в каждой), однократно окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C, помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37°C до следующего измерения. Через 4, 8 и 12 ч после первого измерения клетки второй, третьей и четвертой части соответственно снимали с пластика раствором Версена, дважды промывали PBS, половину оставляли для контроля уровня базовой флуоресценции, вторую половину инкубировали в течение 30 мин в 50 мкл 1 мкМ раствора DARPIn-miniSOG на льду. После окончания инкубации клетки однократно промывали холодным PBS. Флуоресценцию DARPIn-miniSOG измеряли в обеих полученных пробах для каждого временного интервала.

Оценка динамики окраски белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, обработанных папаином

Клетки SK-BR-3 выращивали в течение 14 ч на среде McCoy's 5A (Life technologies, США), содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия). Культуральную среду удаляли, клетки

снимали с пластика и дважды промывали стерильным PBS. Для удаления внеклеточного домена HER2 суспензию клеток 1.5×10^6 инкубировали в 1% растворе папаина (AppliChem, Германия) при 37°C в течение 15 мин. Клетки промывали холодным PBS, делили на семь частей. Первую часть (нулевой момент времени) делили пополам, одну половину ($\sim 12.5 \times 10^4$ клеток) окрашивали белком DARPIn-miniSOG (1 мкМ) при 4°C, вторая половина клеток служила контролем уровня аутофлуоресценции. Оставшиеся пять частей клеток помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37°C на 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч. По истечении указанного временного периода клетки снимали с подложки раствором Версена, промывали холодным PBS, делили пополам, одну половину окрашивали белком DARPIn-miniSOG, как описано выше, вторую оставляли неокрашенной и проводили измерение флуоресценции двух проб для каждого временного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в лаборатории С.М. Деева (ИБХ РАН) был создан адресный белок DARPIn-miniSOG для селективного фотодинамического поражения раковых клеток человека. Адресная часть DARPIn-miniSOG представлена белком неиммуноглобулиновой природы DARPIn_9-29, обладающим высоким сродством к рецептору HER2 [6]. В отличие от часто используемого анти-HER2-мини-антитела 4D5scFv, которое взаимодействует с субдоменом IV внеклеточного домена HER2, DARPIn_9-29 узнает субдомен I того же HER2 [12]. В качестве цитотоксического модуля в рекомбинантном белке DARPIn-miniSOG использован генно-инженерный флавопротеин miniSOG [10], способный под действием синего света генерировать активные формы кислорода. Возбуждение miniSOG синим светом приводит к эмиссии в зеленой области спектра ($\lambda_{\max} = 500$ нм), что позволяет прямо детектировать связывание белка с клетками методом проточной цитофлуориметрии.

Созданный рекомбинантный адресный фототоксин DARPIn-miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность на HER2-положительных клеточных линиях *in vitro*, вызывая некроз клеток, подвергнутых облучению.

Представлялось необходимым изучить особенности взаимодействия гибридного белка DARPIn-miniSOG с опухолевыми клетками, сверхэкспрессирующими HER2, и оценить влияние цитотоксического модуля в составе гибридного белка на способность адресного домена DARPIn_9-29 специфически связываться с рецептором HER2.

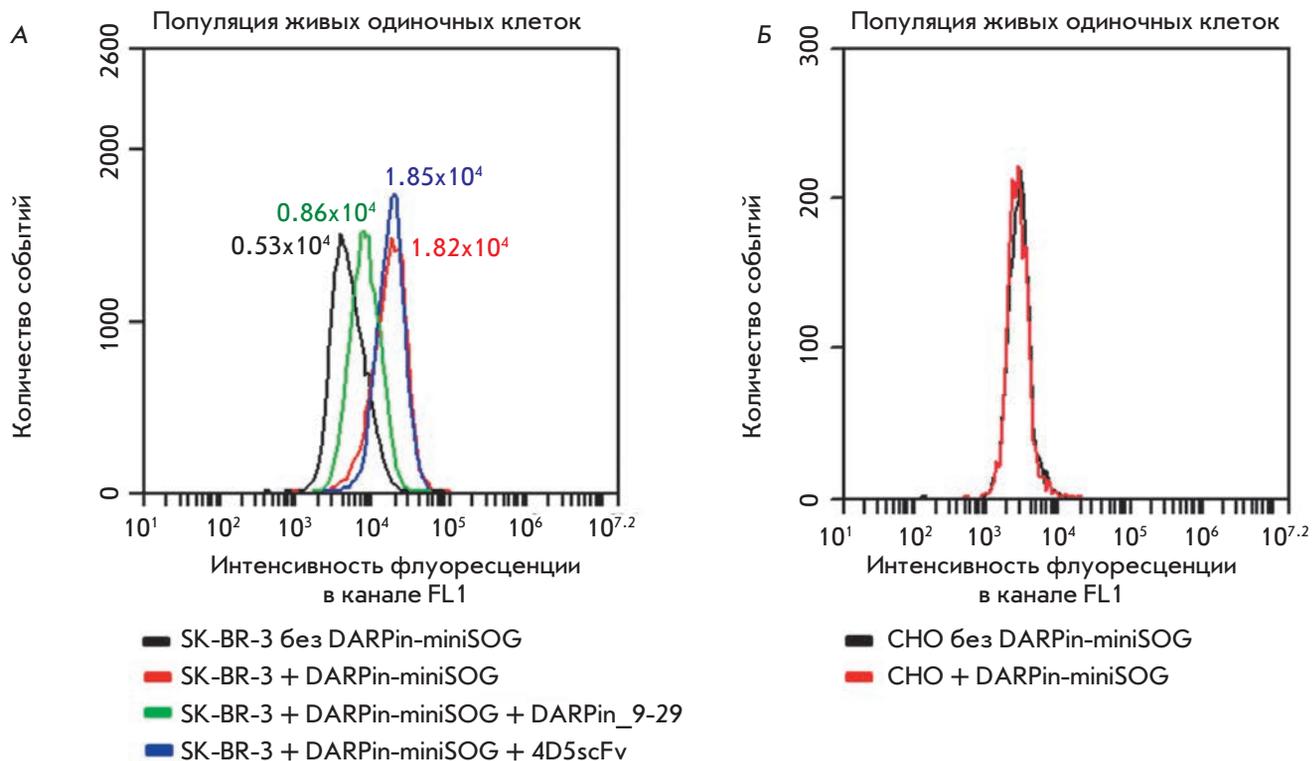


Рис. 1. Оценка способности белка DARPIn-miniSOG специфически взаимодействовать с клетками аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, сверхэкспрессирующими рецептор HER2. А – гистограмма распределения флуоресценции HER2-положительных клеток SK-BR-3, обработанных: белком DARPIn-miniSOG (красная линия), DARPIn-miniSOG в присутствии конкурентного полипептида DARPIn_9-29 (зеленая линия), DARPIn-miniSOG в присутствии неконкурентного мини-антитела 4D5scFv, специфичного к HER2 (синяя линия), и аутофлуоресценции неокрашенных клеток SK-BR-3 (черная линия). Рядом с пиками соответствующим цветом указано численное значение флуоресцентного сигнала в зеленом канале (Mean FL1-A). Б – гистограмма распределения флуоресценции HER2-отрицательных клеток CHO, обработанных белком DARPIn-miniSOG (красная линия), и аутофлуоресценции неокрашенных клеток CHO (черная линия)

Для оценки специфичности взаимодействия DARPIn_9-29 в составе гибридного белка с HER2 мы исследовали эффективность окрашивания клеток SK-BR-3, экспрессирующих рецептор HER2 в количестве $\sim 10^6$ молекул на клетку, гибридным флуоресцентным белком DARPIn-miniSOG с использованием метода конкурентного ингибирования. В качестве конкурирующего агента использовали свободный полипептид DARPIn_9-29. Клетки SK-BR-3 инкубировали с белком DARPIn-miniSOG (500 нМ) или с эквимолярной смесью белка DARPIn-miniSOG (500 нМ) и конкурирующего агента DARPIn_9-29 (500 нМ). Для оценки уровня флуоресценции клетки SK-BR-3 инкубировали с белком при температуре 4°C, что исключает возможность интернализации комплекса рецептор-белок.

Было показано, что средняя интенсивность флуоресценции клеток, обработанных белком DARPIn-miniSOG, почти в 2 раза выше, чем интенсивность

флуоресценции клеток, обработанных смесью белков DARPIn_9-29 и DARPIn-miniSOG (рис. 1А, красная и зеленая линии соответственно), т.е. полипептид DARPIn_9-29 конкурирует с белком DARPIn-miniSOG за связывание с клетками SK-BR-3. Отметим, что при использовании мини-антитела 4D5scFv, узнающего на поверхности HER2 эпитоп, отличный от эпитопа DARPIn_9-29, снижения в значении флуоресценции не происходит (рис. 1А, синяя линия). HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала при инкубации с белком DARPIn-miniSOG (рис. 1Б). Таким образом, установлено, что адресный гибридный белок DARPIn-miniSOG высокоспецифично связывается с клетками аденокарциномы молочной железы, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, а присутствие в его составе цитотоксического модуля miniSOG не влияет на специфичность адресного домена по отношению к HER2.

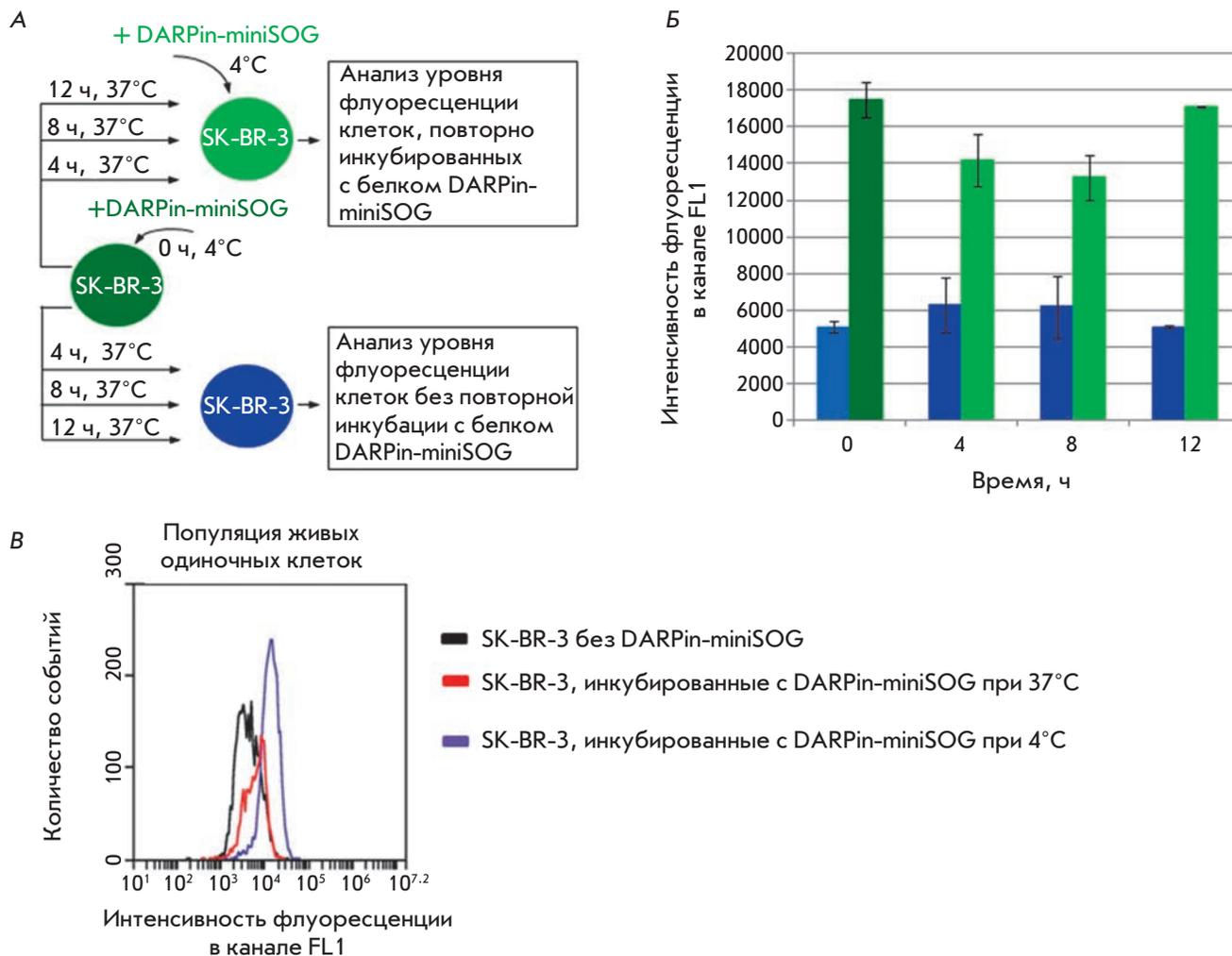


Рис. 2. Взаимодействие белка DARPin-miniSOG с рецептором HER2 клеток SK-BR-3. **А** – схема эксперимента. **Б** – гистограмма изменения во времени уровня флуоресценции HER2-положительных клеток SK-BR-3, обработанных адресным белком DARPin-miniSOG. Голубой столбец на гистограмме показывает уровень исходной аутофлуоресценции клеток SK-BR-3, темно-зеленый столбец – уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, однократно обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C. Синие столбцы соответствуют уровню флуоресценции, сохранившемуся после обработки клеток белком DARPin-miniSOG при 4°C и последующей инкубации при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч. Светло-зеленые столбцы соответствуют уровню флуоресценции клеток, обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C, проинкубированных при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч и обработанных белком DARPin-miniSOG повторно при 4°C. Планки погрешностей на гистограмме показывают стандартное отклонение, посчитанное по результатам двух независимых экспериментов. **В** – изменение уровня флуоресценции клеток SK-BR-3 в зависимости от условий инкубации с белком DARPin-miniSOG

Для установления механизмов воздействия адресного фототоксина DARPin-miniSOG на опухолевую клетку необходимо было выяснить, что происходит с образовавшимся комплексом рецептор–белок после специфичного связывания DARPin-miniSOG с HER2-положительными клетками. Происходит ли интернализация HER2, и если да, то какова дальнейшая судьба HER2 после интернализации – рециркуляция или деградация в поздних лизосомах?

Способность рецептора HER2 к интернализации в настоящее время активно изучается. Процесс лиганд-индуцированной интернализации других рецепторов семейства эпидермального фактора роста (EGFR/HER1 и HER3) описан весьма детально: рецептор, активированный лигандом, подвергается быстрому рецептор-опосредованному эндоцитозу [13]. После интернализации возможна сортировка комплекса рецептор–лиганд в ранней эндосоме (бы-

страя рециркуляция) или в мультивезикулярных тельцах (медленный возврат). И в том и в другом случае рецептор снова экспонируется на мембране. Но возможен и третий путь: деградация комплекса рецептор–лиганд в лизосоме. Судьба рецептора определяется чувствительностью комплекса рецептор–лиганд к кислотной деградации на пути от эндосом к лизосомам. Менее стойкие комплексы диссоциируют раньше, и рецептор подвергается рециркуляции. Более устойчивые комплексы диссоциируют позже, и рецепторы в комплексе с лигандом деградируют в лизосомах [14].

В современной научной литературе существуют две диаметрально противоположных точки зрения на интернализацию рецептора HER2. В то время как одни исследования указывают на то, что HER2 не способен к эндоцитозу [15, 16], в других показано, что HER2 интернализуется, но снова экспонируется на клеточной мембране в результате быстрой эффективной рециркуляции из ранней эндосомы [17–19].

Хорошо известно, что HER2, в отличие от других членов семейства, не имеет природных лигандов, а его внутриклеточный домен лишен сигнала интернализации [20]. Следовательно, изучать эндоцитоз гомодимеров, индуцированный лиганд–рецепторным взаимодействием, невозможно. Есть данные, свидетельствующие о том, что экспрессия HER2 подавляет формирование клатриновых ямок на клеточной поверхности [16, 21]. Приведены доказательства того, что HER2 способен ингибировать лиганд–активированную интернализацию других рецепторов семейства эпидермального фактора роста при образовании гетеродимеров с ними [22]. На сегодняшний день доказано, что гуманизированное моноклональное антитело Трастузумаб (Herceptin), широко применяемое в терапии HER2-положительных опухолей молочной железы, само по себе не способно приводить к интернализации HER2 [23], как предполагалось первоначально. Однако сочетанное использование Трастузумаба с другим, неконкурентным, антителом – Пертузумабом (Perjeta) или с антителом L26, которое, как и Пертузумаб, препятствует образованию гетеродимеров рецептора HER2 с другими членами семейства эпидермального фактора роста, приводит к эффективной интернализации HER2 и его деградации [24–26].

Есть данные, согласно которым не только полно-размерные антитела, но и мини-антитела формата scFv, специфичные к внеклеточному домену HER2, вызывают интернализацию рецептора HER2. Так, в работе [27] показано, что инкубация HER2-положительных клеток BT-474 с комплексом 4D5scFv–дибарназа, представляющим собой одноцепочечный варибельный фрагмент мини-

антитела 4D5 к рецептору HER2/neu, соединенный с двумя молекулами барназы – цитотоксической РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens*, при 37°C приводит к полному удалению рецептора с поверхности клеток. При этом рецептор обнаруживается в эндосомах и мультивезикулярных тельцах [27]. Также возможность интернализации рецептора HER2 показана при его взаимодействии с гибридным белком DARPIn-mCherry, узнающим внеклеточный домен HER2 [28].

В настоящей работе изучена интернализация рецептора HER2 при его связывании с белком DARPIn-miniSOG.

Схема эксперимента представлена на рис. 2А. При этом сначала определяли уровень флуоресценции клеток, окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C (условия, в которых интернализация не идет) (рис. 2Б, темно-зеленый столбец, время 0 ч), в сравнении с аутофлуоресценцией (рис. 2Б, голубой столбец, время 0 ч). Затем определяли уровень флуоресценции этих однократно окрашенных клеток через 4, 8 и 12 ч после инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе (условия, в которых идет интернализация) без повторного окрашивания (рис. 2Б, синие столбцы, время 4, 8 и 12 ч соответственно) и после их повторной окраски на холоду белком DARPIn-miniSOG (рис. 2Б, светло-зеленые столбцы, время 4, 8 и 12 ч соответственно). Отметим, что белок DARPIn-miniSOG для этих опытов брали в количестве, избыточном по отношению к количеству рецептора на клетках.

Об интернализации комплекса HER2/DARPIn-miniSOG свидетельствует резкое падение интенсивности флуоресценции клеток SK-BR-3, инкубированных с белком DARPIn-miniSOG при 37°C, по сравнению с клетками, инкубированными с белком DARPIn-miniSOG при 4°C: в течение 10 мин инкубации при 37°C происходит падение средней интенсивности флуоресценции более чем в 2 раза (рис. 2В). При этом показано, что средняя интенсивность флуоресценции клеток SK-BR-3, предварительно окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C, после их инкубации при 37°C (в условиях интернализации) превышает исходный уровень средней интенсивности аутофлуоресценции в 1.4 раза через 4 ч, в 1.3 раза через 8 ч и снижается почти до исходного уровня аутофлуоресценции через 12 ч (рис. 2Б, синие столбики).

Способность клеток SK-BR-3 повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG при 4°C по сравнению с контрольными клетками SK-BR-3, однократно обработанными белком DARPIn-miniSOG при 4°C (темно-зеленый столбик), через 4 ч снижается в 1.2 раза, а через 8 ч – в 1.4 раза (рис. 2Б, светло-зеленые столбики). Через 12 ч способность клеток SK-BR-3

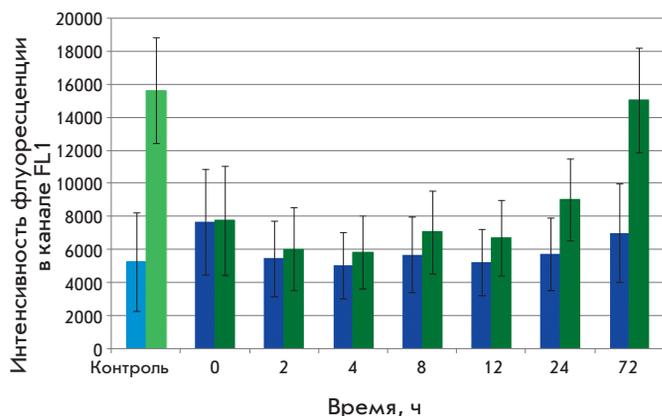


Рис. 3. Динамика окраски белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, обработанных папаином. В качестве контроля взяты клетки SK-BR-3, необработанные папаином: голубой столбец – уровень исходной аутофлуоресценции клеток SK-BR-3, светло-зеленый столбец – уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных белком DARPIn-miniSOG при 4°C. Синие столбцы каждой временной точки соответствуют уровню флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных папаином. Темно-зеленые столбцы соответствуют уровню флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных папаином в нулевой момент времени и окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C через 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч. Планки погрешностей на гистограмме показывают стандартное отклонение

повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG при 4°C возвращается к первоначальному уровню.

Способность клеток повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG после инкубации при 37°C может обуславливаться распадом комплекса HER2/DARPIn-miniSOG и возвратом рецептора HER2 на мембрану, а также быстрым биосинтезом новых молекул рецептора.

Для изучения вклада биосинтеза новых молекул рецептора была изучена динамика окрашивания белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, с поверхности которых с помощью папаина удален внеклеточный домен HER2. Через 12 и 24 ч после удаления внеклеточного домена HER2 уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, окрашенных DARPIn-miniSOG, со-

ставлял всего 43 и 57% от исходного соответственно и достигал первоначального уровня лишь через 72 ч (рис. 3). Таким образом, показано, что за 12 ч клетки SK-BR-3, лишённые рецептора HER2, не успевают полностью восстановить способность окрашиваться белком DARPIn-miniSOG, т.е. наработать рецептор HER2 в количестве, соответствующем клеткам SK-BR-3, не обработанным папаином (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень рецептора HER2 на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы не является неизменным: при связывании белка DARPIn-miniSOG с рецептором HER2 происходит интернализация комплекса HER2/DARPIn-miniSOG, число молекул рецептора на поверхности клетки при этом уменьшается и соответственно уменьшается флуоресценция клеток, повторно окрашенных белком DARPIn-miniSOG (рис. 2). Через ~12 ч среднее значение интенсивности флуоресценции повторно окрашенных клеток достигает исходного значения. Таким образом, на основании проведенных экспериментов и учитывая динамику биосинтеза HER2, следует сделать вывод, что после интернализации комплекса HER2/DARPIn-miniSOG происходит его распад и медленный возврат рецептора HER2 на клеточную мембрану. При этом поступление вновь синтезированных молекул рецептора HER2 на мембрану клеток невелико и не вносит большого вклада в среднее значение интенсивности флуоресценции окрашенных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе выявлены закономерности специфического взаимодействия белка DARPIn-miniSOG с рецептором HER2, получены данные, свидетельствующие об интернализации рецептора HER2 в комплексе с DARPIn-miniSOG и последующем возврате рецептора на клеточную мембрану. Полученные данные важны для дальнейшей разработки методов терапии HER2-положительных опухолей на основе нового фотоситотоксического белка DARPIn-miniSOG. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00106).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
2. Deyev S.M., Lebedenko E.N. // BioEssays. 2008. V. 30. № 9. P. 904–918.
3. Boersma Y.L., Plückerthun A. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 6. P. 849–857.
4. Löfblom J., Frejd F.Y., Ståhl S. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 6. P. 843–848.
5. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // Успехи химии. 2015. Т. 84. Вып. 1. С. 1–26. (Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Rus. Chem. Rev. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.)

6. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
7. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. // *Science.* 1987. V. 235. № 4785. P. 177–182.
8. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. // *Science.* 1989. V. 244. № 4905. P. 707–712.
9. Holbro T., Hynes N.E. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. V. 44. P. 195–217.
10. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. e1001041.
11. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
12. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure.* 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
13. Sorkin A., Goh L.K. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. № 4. P. 683–696.
14. Sorkin A., Waters C.M. // *BioEssays.* 1993. V. 15. № 6. P. 375–382.
15. Hommelgaard A.M., Lerdrup M., van Deurs B. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 4. P. 1557–1567.
16. Haslekas C., Breen K., Pedersen K.W., Johannessen L.E., Stang E., Madshus I.H. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 12. P. 5832–5842.
17. Harari D., Yarden Y. // *Oncogene.* 2000. V. 19. № 53. P. 6102–6114.
18. Hendriks B.S., Opresko L.K., Wiley H.S., Lauffenburger D. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 5. P. 1130–1137.
19. Austin C.D., de Maziere A.M., Pisacane P.I., van Dijk S.M., Eigenbrot C., Sliwkowski M.X., Klumperman J., Scheller R.H. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 12. P. 5268–5282.
20. Sorkin A., Di Fiore P.P., Carpenter G. // *Oncogene.* 1993. V. 8. № 11. P. 3021–3028.
21. Cortese K., Howes M.T., Lundmark R., Tagliatti E., Bagnato P., Petrelli A., Bono M., McMahon H.T., Parton R.G., Tacchetti C. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 2. P. 129–144.
22. Wang Z., Zhang L., Yeung T.K., Chen X. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. № 5. P. 1621–1636.
23. Longva K.E., Pedersen N.M., Haslekas C., Stang E., Madshus I.H. // *Int. J. Cancer.* 2005. V. 116. № 3. P. 359–367.
24. Ben-Kasus T., Schechter B., Lavi S., Yarden Y., Sela M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 9. P. 3294–3299.
25. Nahta R., Hung M.C., Esteva F.J. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 7. P. 2343–2346.
26. Friedman L.M., Rinon A., Schechter B., Lyass L., Lavi S., Bacus S.S., Sela M., Yarden Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 6. P. 1915–1920.
27. Ivanova J.L., Edelweiss E.F., Leonova O.G., Balandin T.G., Popenko V.I., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 8. P. 1833–1836.
28. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 12. С. 1698–1704.

УДК 577.2.04

Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы: роль ER α и HER2/neu

А. М. Щербаков*, О. Е. Андреева

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское ш., 24

*E-mail: alex.scherbakov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2015

РЕФЕРАТ Фитоэстрогены – соединения растительного происхождения, обладающие эстрогеноподобной активностью. В организме млекопитающих фитоэстрогены связываются с рецепторами эстрогенов (ER) и участвуют в регуляции роста клеток и транскрипции генов. Некоторые фитоэстрогены могут оказывать цитотоксическое и антипролиферативное воздействие на опухолевые клетки. Изучено действие представителей основных групп фитоэстрогенов на клетки рака молочной железы с различным рецепторным статусом, проанализированы молекулярные пути, отвечающие за реализацию антипролиферативного эффекта лидерного соединения. Антипролиферативный эффект высоких доз фитоэстрогенов (апигенина, генистеина, кверцетина, нарингенина) не зависел от статуса рецепторов стероидных гормонов в клетках рака молочной железы. Соединения этого класса проявили сходную эффективность в ER-положительной и ER-отрицательной модели. Наибольшая антипролиферативная активность обнаружена при инкубации клеток рака молочной железы с апигенином, наименьшая – с нарингенином. Апигенин в высоких дозах (50 мкМ) ингибировал активность рецепторов эстрогенов, индуцированную 17 β -эстрадиолом, и не проявлял эстрогеноподобную активность. Культивирование HER2-положительных клеток линии SKBR3 с апигенином приводит к снижению экспрессии HER2/neu с параллельной деградацией последнего субстрата каспаз – белка PARP. Таким образом, антипролиферативные эффекты высоких доз фитоэстрогенов в клетках рака молочной железы не зависят от рецепторов стероидных гормонов. Среди изученных соединений наиболее перспективным в качестве противоопухолевого средства является апигенин, значительно ингибирующий пролиферацию и вызывающий гибель клеток рака молочной железы, в том числе HER2-положительных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак молочной железы, рецепторы эстрогенов, фитоэстрогены, HER2/neu.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы – наиболее распространенное онкологическое заболевание среди женщин, занимающее второе место по частоте среди населения России после новообразований кожи [1–4]. Поиск новых потенциальных соединений, останавливающих развитие рака молочной железы, и анализ их воздействия на клетки опухоли – одна из приоритетных задач онкологии. Учитывая важную роль гормонов в развитии опухолей репродуктивной системы, особый интерес вызывают соединения, близкие по структуре к эстрогенам, такие, как фитоэстрогены. Фитоэстрогены – соединения растительного происхождения, имеющие стероидоподобную структуру [5]. Благодаря «гормональным» свойствам фитоэстрогены также называют «пищевыми гормонами». Уникальность фитоэстрогенов заключается в их парадоксальном действии на клетки: при одних условиях они могут тормозить рост опухоли, при других – выполнять функции клеточного протектора [5–7].

Первоначально интерес к исследованию фитоэстрогенов сформировался в результате анализа эпидемиологических данных, свидетельствующих о снижении частоты возникновения опухолей и смертности от онкологических заболеваний в ряде географических районов с высоким потреблением фруктов и овощей [8–10]. Проведенное в Финляндии Knekt и соавт. [8] исследование включало 9959 человек, которых систематически наблюдали с 1967 по 1991 г. и анализировали в этой группе индивидуальное потребление фитоэстрогенов с пищей. За весь период наблюдения выявлено 997 случаев (около 10% от всей выборки) онкологических заболеваний, из которых 151 – рак легкого. Статистический анализ показал, что в группе с высоким потреблением фитоэстрогенов относительный риск возникновения опухолей (всех локализаций) снижается до 0.8 (за 1 условно принят уровень риска в группе с низким потреблением фитоэстрогенов). Наиболее значимые результаты получены при анализе заболеваемости

раком легких – в этом случае в группе с высоким потреблением фитоэстрогенов риск падал до 0.54 [8]. Схожие тенденции обнаружены при обследовании 1031 больной раком яичников и 2411 здоровых доноров в Италии в период с 1992 по 1999 г. [11]. Согласно Rossi и соавт. [11], риск возникновения рака яичников в группе с высоким потреблением флавонолов (в частности, кверцетина) падает до 0.63, а в группе с высоким употреблением пищи, богатой изофлавонами (например, генистеином), – до 0.51. Таким образом, эпидемиологические данные доказывают целесообразность увеличения потребления продуктов, богатых фитоэстрогенами, для профилактики онкологической заболеваемости.

Эпидемиологические данные не позволяют точно понять с помощью каких молекулярных механизмов фитоэстрогены воздействуют на опухолевые клетки и/или защищают нормальные клетки от злокачественной трансформации. Именно поэтому в настоящее время проводятся активные поиски основных внутриклеточных мишеней соединений этого класса на моделях *in vitro* [12–17]. Ключевыми мишенями фитоэстрогенов в опухолевых клетках принято считать рецепторные тирозинкиназы, такие, как EGFR (Epidermal growth factor receptor) [18–20], FGFR2 (Fibroblast growth factor receptor 2) [21], HER2/neu [22], VEGFR3 (Vascular endothelial growth factor receptor 3) [21, 23], PDGFR α , β (Platelet-derived growth factor receptor alpha, -beta) [21] и др. Помимо рецепторного аппарата, некоторые представители класса фитоэстрогенов эффективно ингибируют внутриклеточные киназы, участвующие в регуляции пролиферации и выживаемости клеток: PAK3 (p21-activated kinase 3), PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase), Akt, PIM1, Aurora-A, JAK3 (Janus kinase 3) и др. [15, 16, 21]. Широкий спектр потенциальных мишеней фитоэстрогенов делает эти соединения достаточно перспективными для дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Необходим ли рецептор эстрогенов (ER) для реализации антипролиферативного действия фитоэстрогенов на опухолевые клетки, изменяется ли гормоноподобный эффект этих соединений при увеличении концентрации? Окончательный ответ на эти вопросы не получен [5, 6, 17]. Целью настоящей работы было исследование действия представителей основных групп фитоэстрогенов на клетки рака молочной железы с различным рецепторным статусом, а также анализ молекулярных путей, отвечающих за реализацию антипролиферативного и цитотоксического эффекта лидерного соединения. На клеточных линиях рака молочной железы человека мы показали, что антипролиферативное воздействие высоких доз фитоэстроге-

нов (апигенин, генистеин, кверцетин, нарингенин) не зависело от статуса рецепторов стероидных гормонов. В экспериментах *in vitro* обнаружена сходная эффективность соединений этого класса на ER-положительной линии клеток MCF-7 и ER-отрицательной модели SKBR3. Максимальное антипролиферативное действие оказывал флавоноид апигенин, который мы анализировали более подробно в качестве лидерного соединения. Показано, что с увеличением концентрации апигенина с 5 до 50 мкМ в клетках MCF-7 происходит «переключение» с эстрогеноподобных (схожих с действием 17 β -эстрадиола, естественного лиганда ER α) эффектов на антиэстрогеновые (схожие с действием препаратов группы антиэстрогенов): в высокой дозе апигенин препятствовал активирующему действию 17 β -эстрадиола на рецептор эстрогенов. Известно, что для ER-негативных клеток рака молочной железы SKBR3 характерно высокое содержание HER2/neu – одного из ключевых рецепторов, определяющих высокую выживаемость и агрессивность опухолевых клеток [24]. Методом иммуноблоттинга показано, что апигенин в дозе более 25 мкМ снижает экспрессию HER2/neu в клетках SKBR3 с параллельной деградацией субстрата эффекторов апоптоза – PARP (poly ADP-ribose polymerase). Среди исследованных соединений наиболее перспективным оказался апигенин, значительно ингибирующий рост клеток рака молочной железы с различным статусом ER α , в том числе HER2-положительных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изучали фитоэстрогены различных групп – апигенин (флавоноид), нарингенин (флаванон), генистеин (изофлавоноид), кверцетин (флавоноид). Кверцетин, генистеин и нарингенин приобретены в Sigma-Aldrich (США), апигенин – в Enzo Biochem (США), химическая чистота каждого препарата была не ниже 97%. Химические структуры соединений приведены на рис. 1. Соединения растворяли в диметилсульфоксиде в концентрации 50 мМ и хранили растворы до использования при –20°C.

Клетки рака молочной железы человека MCF-7 (ER α + /HER2-) и SKBR3 (ER α - /HER2+) получены из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клеточные линии культивировали *in vitro* в стандартной среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл, «ПанЭко», Россия) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–90%. Скорость роста клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромид) [25, 26].



Рис. 1. Химические структуры фитоэстрогенов (апигенин, нарингенин, генистеин, кверцетин)

Для определения транскрипционной активности ER α клетки трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем элемента, реагирующего на ER (ERE/Luc), плазида была любезно предоставлена George Reid (European Molecular Biology Laboratory, Германия) [27]. Клетки трансфицировали с использованием реагента Metafectene[®] PRO, следуя рекомендациям производителя (Biontix Laboratories, Германия). Эффективность и потенциальную токсичность трансфекции контролировали с помощью котрансфекции клеток плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы. Активность люциферазы рассчитывали в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в образцах).

Для проведения иммуноблотинга клетки на стадии 80% монослоя снимали с чашек (60 мм, Corning, США) в 1 мл фосфатного буфера. Далее для получения суммарного клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-HCl pH 7.4, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 1% Igepal CA-630, 0.25% дезоксихолат Na, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1 мМ PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride); 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина; 1 мМ ортованадат Na и 1 мМ NaF. Суммарные клеточные экстракты обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе SoniPrep 150 Plus (MSE) (пять циклов по 10 с с амплитудой 3.2) для снижения вязкости раствора. Затем образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, +4[°]C, центрифуга Eppendorf 5417R, Германия) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблотинг. Уровень HER2/neu и PARP определяли с помощью первичных антител (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффек-

тивности иммуноблотинга и нормирования результатов использовали антитела к β -актину (Cell Signaling Technology, США). Детекцию проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США), в системе для анализа LAS 4000 (GE HealthCare, США). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы DATAPLOT (США). Во всех случаях статистические критерии считали значимыми при $p < 0.05$; каждый опыт воспроизводили минимум 3 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение цитостатических свойств фитоэстрогенов из различных групп в отношении клеток рака молочной железы: выбор лидерного соединения

На первом этапе исследования оценивали антипролиферативное действие высоких доз фитоэстрогенов с помощью теста МТТ. ER α -позитивные клетки линии MCF-7 рассеивали на культуральные плашки и через 24 ч добавляли фитоэстрогены апигенин (флавоон), нарингенин (флаванон), генистеин (изофлавоон), кверцетин (флавонол). Обнаружено, что инкубация клеток в течение 3 сут с нарингенином практически не вызывает антипролиферативных эффектов. Генистеин оказывал большее антипролиферативное действие и в дозе 50 мкМ приводил к снижению на 40% количества живых клеток. Схожую с генистеином активность проявлял кверцетин – представитель группы флавонолов. Наибольший антипролиферативный эффект оказывал апигенин (рис. 2А) в концентрации 50 мкМ (по данным МТТ-теста 20% клеток MCF-7 по сравнению с контролем).

Для ответа на вопрос о возможном влиянии экспрессии ER α на чувствительность клеток к антипролиферативному действию фитоэстрогенов (в высоких концентрациях) использовали ER α -негативную клеточную линию SKBR3. Распределение клеток SKBR3 по чувствительности к различным фитоэстрогенам было сходным с распределением ER α -положительных клеток MCF-7. Наименее токсичным оказался также нарингенин. Генистеин и кверцетин показали средний антипролиферативный эффект. Самой высокой антипролиферативной активностью обладал апигенин: в дозе 50 мкМ этот препарат вызывал гибель 60% клеток SKBR3 (инкубация 3 сут с фитоэстрогенами, рис. 2Б). Необходимо отметить, что при инкубации клеток с фитоэстрогенами в указанном диапазоне концентраций (до 50 мкМ) только кверцетин (клетки MCF-7) и апигенин (клетки MCF-7 и SKBR3) достигают уровня IC₅₀ (таблица). Таким образом, нарингенин и генистеин являются достаточ-

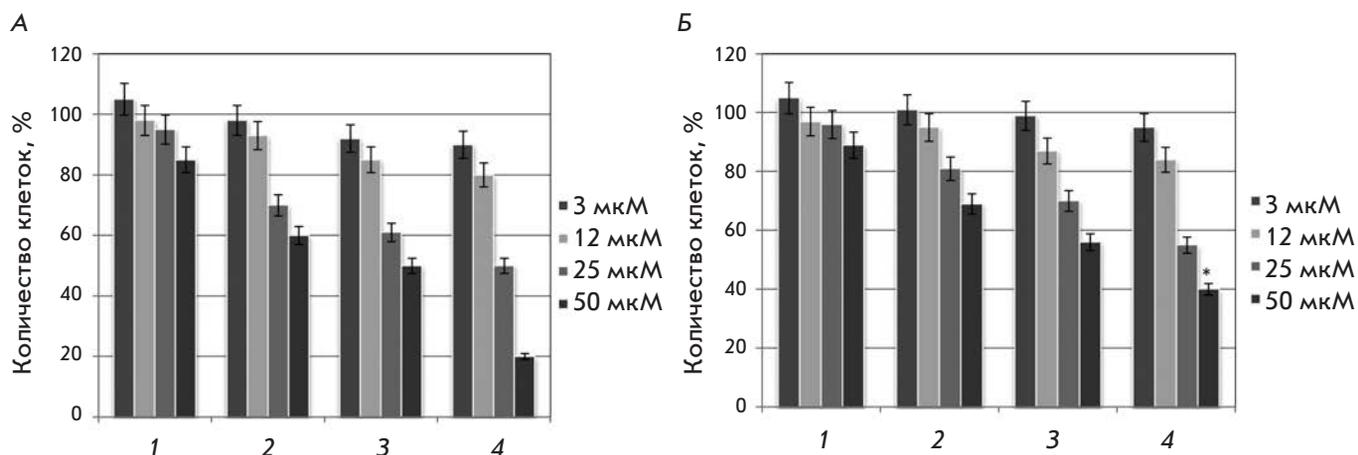


Рис. 2. Цитостатические свойства фитоэстрогенов в отношении клеток рака молочной железы MCF-7 (А) и SKBR3 (Б). Результаты МТТ-теста, проведенного через 3 сут роста клеток с фитоэстрогенами: 1 – нарингенин, 2 – генистеин, 3 – кверцетин, 4 – апигенин. На диаграмме представлены данные о количестве живых клеток после обработки фитоэстрогенами. За 100% принимали количество контрольных клеток соответствующей клеточной линии. * $p < 0.05$ – при сравнении с количеством клеток MCF-7, выживших при дозе апигенина 50 мкМ

Определение IC_{50} исследованных фитоэстрогенов

| IC_{50} , мкМ | Нарингенин | Генистеин | Кверцетин | Апигенин |
|-----------------|------------|-----------|-----------|----------|
| MCF-7 | > 50 | > 50 | 50 | 25 |
| SKBR3 | > 50 | > 50 | > 50 | 30 |

но «слабыми» антипролиферативными агентами, их целесообразно тестировать в комбинации с соединениями других классов, например, с антиэстрогенами группы SERM (тамоксифеном и др.) или специфическими ингибиторами тирозинкиназ. Сравнение количества жизнеспособных клеток MCF-7 и SKBR3 после инкубации в течение 3 сут с апигенином в концентрации 50 мкМ показало, что линия SKBR3 более устойчива к цитостатическому действию апигенина, чем MCF-7 (40 и 20% клеток по сравнению с контролем соответственно, $p < 0.05$). Основываясь на этом наблюдении, мы предположили, что апигенин в высоких дозах может подавлять как сигнальный путь рецептора эстрогенов (важный фактор для роста клеток MCF-7), так и рецепторные тирозинкиназы, в частности HER2/neu (сверхэкспрессия этого рецептора выявлена в клетках SKBR3).

Результаты данной серии опытов позволяют сделать вывод о том, что наибольший антипролиферативный эффект среди проанализированных фитоэстрогенов оказывает апигенин. В дальнейшем изучали молекулярные механизмы действия высоких доз этого фитоэстрогена на клетки рака молочной железы.

Влияние апигенина на активность рецептора эстрогенов

Тенденции, рассмотренные в предыдущем разделе, свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект фитоэстрогенов в отношении клеток рака молочной железы увеличивается с ростом их концентрации. Важно отметить, что обнаруженный эффект не зависит от гормонального статуса клеток, однако линия MCF-7, в которой экспрессируется ER α , более чувствительна к антипролиферативному действию апигенина в высоких дозах (50 мкМ), чем ER α -негативная линия SKBR3. Мы предположили, что с ростом концентрации апигенина происходит «выключение» гормонального компонента в его действии на клетки рака молочной железы. Для проверки этой гипотезы клетки MCF-7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерную конструкцию с геном люциферазы под контролем эстроген-чувствительного промотора. Затем клетки переводили в среду DMEM без фенолового красного («ПанЭко», Россия) и культивировали в течение 24 ч с добавлением 10% бесстероидной эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США). Активность люциферазы определяли через 7 ч роста клеток

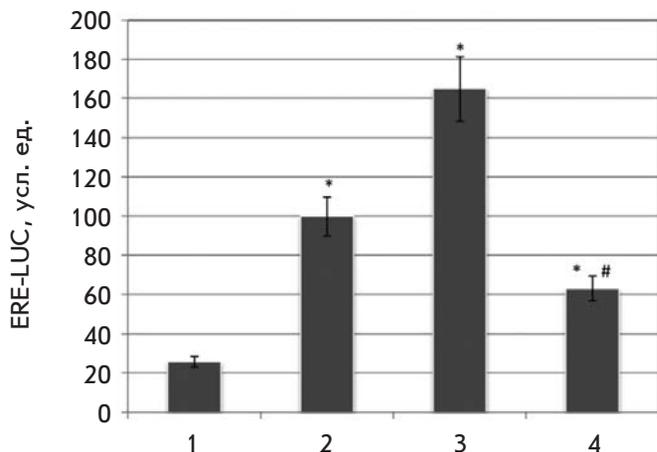


Рис. 3. Влияние апигенина на активность рецептора эстрогенов, индуцированную 17β-эстрадиолом. После трансфекции репортерной плазмиды клетки MCF-7 рассеивали на 24-луночный планшет и через 24 ч обрабатывали 17β-эстрадиолом и апигенином (1 – контрольные клетки MCF-7, 2 – 10 нМ 17β-эстрадиола, 3 – 10 нМ 17β-эстрадиола и 5 мкМ апигенина, 4 – 10 нМ 17β-эстрадиола и 50 мкМ апигенина). Активность люциферазы определяли после роста в течение 7 ч с фитоэстрогенами по стандартному протоколу производителя реактивов (Promega, США). * $p < 0.05$ – при сравнении с контрольными клетками; # $p < 0.05$ – при сравнении столбцов № 4 и № 3

с 17β-эстрадиолом и апигенином. Как представлено на рис. 3, апигенин в низкой дозе оказывал эстрогеноподобный эффект и усиливал индуцирующее воздействие 17β-эстрадиола на рецептор эстрогенов. Увеличение концентрации апигенина в 10 раз (до 50 мкМ) приводило к обратному эффекту: фитоэстроген подавлял активность рецептора эстрогенов и препятствовал действию 17β-эстрадиола. Таким

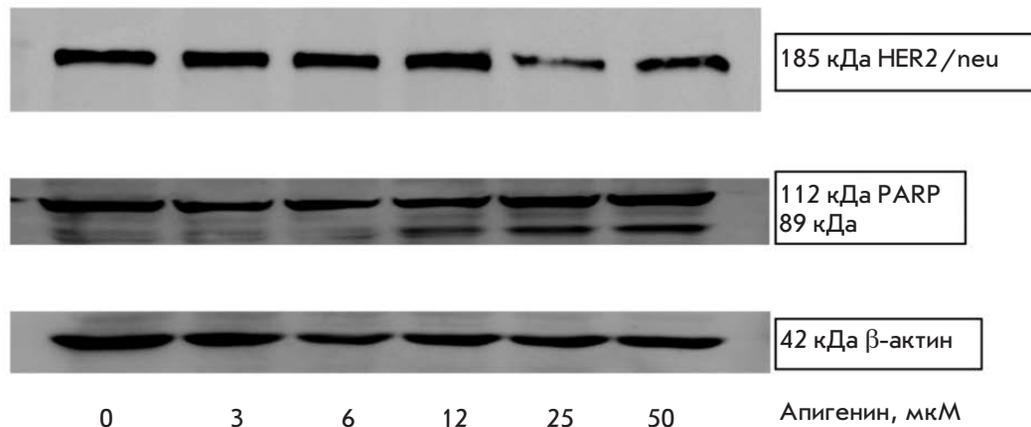
образом, одним из объяснений цитостатических эффектов высоких (50 мкМ) доз апигенина могут быть его антиэстрогеновые свойства. Полученные данные частично объясняют действие апигенина в клетках MCF-7 – апигенин блокирует основной пролиферативный стимул для этой опухолевой линии. Какую «мишень» блокирует апигенин в ERα-негативных клетках рака молочной железы линии SKBR3? Этот вопрос изучали в следующей серии опытов.

Изменение уровня HER2/neu при инкубации клеток рака молочной железы с апигенином

Известно, что в 10–30% случаев рака молочной железы выявляется экспрессия HER2/neu, который рассматривается как маркер плохого прогноза [28, 29]. Нами проанализировано влияние апигенина на экспрессию HER2/neu в клетках SKBR3, продуцирующих этот белок в достаточно большом количестве. Из рис. 4 видно, что в концентрации от 3 до 12 мкМ апигенин не вызывает изменения уровня HER2/neu в клетках SKBR3. При инкубации клеток с апигенином в более высоких дозах (25 и 50 мкМ) обнаружено значительное подавление экспрессии HER2/neu. Иммуноблоттинг с антителами к PARP, субстрату эффекторов апоптоза, выявил его частичную деградацию (фиксируется как накопление укороченной формы PARP 89 кДа) при увеличении концентрации апигенина в клетках SKBR3.

Способность фитоэстрогенов снижать содержание HER2/neu в опухолевых клетках была обнаружена Mai и соавт. [30] при инкубации клеточной линии рака молочной железы человека BT-474 (HER2/neu+, ERα+) с генистеином в концентрации 25 мкМ. Кроме того, культивирование клеток BT-474 с генистеином и антиэстрогеном тамоксифеном приводило к еще большему снижению экспрессии HER2/neu. Аналогичный эффект наблюдали

Рис. 4. Влияние апигенина на экспрессию HER2/neu и деградацию PARP в клетках SKBR3. Клетки SKBR3 обрабатывали в течение 3 сут апигенином в концентрации, указанной на рисунке. Приведены результаты одного из трех независимых опытов



и для другого представителя семейства рецепторов HER – EGFR (HER1) [30]. Уровень фосфорилирования киназ HER2/neu и EGFR не анализировали, так как биологический эффект генистеина в данном случае определялся именно снижением содержания его белка-мишени (но не его активности). Sakla и соавт. [31] подтвердили данные о снижении уровня HER2/neu [30], а также показали, что даже в низких дозах (1 мкМ) генистеин снижает уровень фосфорилирования HER2/neu в клетках BT-474. Представленные нами данные о снижении уровня HER2/neu в клетках SKBR3 при инкубации с апигенином согласуются с полученными на другой клеточной модели, линии рака молочной железы MDA-MB-453, результатами [32]. Показано, что фитоэстрогены апигенин, лютеолин, нарингенин, эриодиктиол и хесперетин в высокой дозе (40 мкМ) вызывают деградацию HER2/neu в клетках MDA-MB-453. Обнаружено, что инициация апоптоза при инкубации клеток с апигенином происходит через высвобождение цитохрома с и активацию каспазы 3. Суммируя наши результаты и опубликованные данные, можно заключить, что высокие дозы апигенина снижают экспрессию одной из основных тирозинкиназ, поддерживающих рост HER2-положительных клеток, и параллельно иницируют процессы апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитотоксические и антипролиферативные свойства фитоэстрогенов в отношении злокачественных клеток активно исследуются в настоящее время [14, 33–38]. Интерес к фитоэстрогенам в значительной степени подкреплен природным происхождением этих соединений и относительно низкой себестоимостью синтеза и очистки. Кроме того, получены данные о перспективности использования фитоэстрогенов для профилактики онкологических заболеваний [38, 39]. В нашей работе основное внимание уделено изучению свойств флавоноа апигенина, проявившего высокую антипролиферативную активность на клетках с различным статусом рецепторов эстрогенов.

Показано, что в высоких дозах апигенин препятствует активации рецептора эстрогенов 17β-эстрадиолом, а в HER2-положительных клетках рака молочной железы вызывает подавление экспрессии HER2/neu с параллельной деградацией PARP. В клетках рака молочной железы найдены и другие мишени апигенина, в том числе белки, поддерживающие рост и выживаемость опухоли: PI3K/Akt [40], STAT3 [33], NF-κB [34], p53 [34, 41], p21 [41], JAK3 [42], циклины D1, D3 и Cdk4 [43], VEGF [44]. По-видимому, апигенин является мультитаргетным соединением, запускающим гибель клеток рака молочной железы через ингибирование рецепторных тирозинкиназ, снижение экспрессии факторов роста, активацию p53 и подавление ключевых факторов транскрипции. В 2008 г. в базе данных ClinicalTrials.gov зарегистрировано клиническое исследование второй фазы (NCT00609310) препарата, содержащего 20 мг апигенина и 20 мг эпигаллокатехина, у больных колоректальным раком. В 2016 г. в рамках этого исследования планируется получить первые сведения об изменении частоты рецидивов заболевания у больных, получавших смесь этих фитоэстрогенов. Другие клинические исследования апигенина (как противоопухолевого средства) в базе ClinicalTrials.gov в настоящий момент не зарегистрированы. Дальнейшее исследование противоопухолевой активности апигенина и его синтетических производных представляется достаточно перспективным, особенно в отношении HER2-положительных опухолей молочной железы. ●

Авторы выражают благодарность М.А. Красильникову за обсуждение результатов экспериментов и текста статьи и George Reid за предоставление плазмиды ERE/LUC.

Работа финансировалась из средств грантов РФФ (№ 14-15-00362, эксперименты раздела № 2) и РФФИ (№ 15-04-02172, эксперименты разделов № 1 и 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merabishvili V.M. // *Voprosy Onkologii*. 2013. V. 59. № 3. P. 314–319.
2. DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L., Alteri R., Robbins A.S., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2014. V. 64. № 4. P. 252–271.
3. DeSantis C., Ma J., Bryan L., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2014. V. 64. № 1. P. 52–62.
4. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2015.
5. Bilal I., Chowdhury A., Davidson J., Whitehead S. // *World J. Clin. Oncol.* 2014. V. 5. № 4. P. 705–712.
6. Patisaul H.B., Jefferson W. // *Front Neuroendocrinol.* 2010. V. 31. № 4. P. 400–419.
7. Bhukhai K., Suksen K., Bhummapan N., Janjorn K., Thongon N., Tantikanlayaporn D., Piyachaturawat P., Suksamrarn A., Chairoungdua A. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 43. P. 36168–36178.
8. Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Hellevoora M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. // *Am. J. Epidemiol.* 1997. V. 146. № 3. P. 223–230.
9. Mourouti N., Panagiotakos D.B. // *Maturitas.* 2013. V. 76. № 2. P. 118–122.
10. Qu X.L., Fang Y., Zhang M., Zhang Y.Z. // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014. V. 15. № 21. P. 9085–9091.

11. Rossi M., Negri E., Lagiou P., Talamini R., Dal Maso L., Montella M., Franceschi S., La Vecchia C. // *Internat. J. Cancer*. 2008. V. 123. № 4. P. 895–898.
12. Spoerlein C., Mahal K., Schmidt H., Schobert R. // *J. Inorg Biochem*. 2013. V. 127. P. 107–115.
13. Harrison M.E., Power Coombs M.R., Delaney L.M., Hoskin D.W. // *Exp. Mol. Pathol*. 2014. V. 97. № 2. P. 211–217.
14. Bai H., Jin H., Yang F., Zhu H., Cai J. // *Scanning*. 2014. V. 36. № 6. P. 622–631.
15. Maurya A.K., Vinayak M. // *Nutr. Cancer*. 2015. V. 67. № 2. P. 354–363.
16. Li S.Z., Qiao S.F., Zhang J.H., Li K. // *Anticancer Agents Med. Chem*. 2015. V. 15 (Epub ahead of print).
17. Chen F.P., Chien M.H., Chern I.Y. // *Climacteric*. 2015 (Epub ahead of print).
18. Gruca A., Krawczyk Z., Szeja W., Gryniewicz G., Rusin A. // *Molecules*. 2014. V. 19. № 11. P. 18558–18573.
19. Gadgeel S.M., Ali S., Philip P.A., Wozniak A., Sarkar F.H. // *Cancer*. 2009. V. 115. № 10. P. 2165–2176.
20. Firdous A.B., Sharmila G., Balakrishnan S., RajaSingh P., Suganya S., Srinivasan N., Arunakaran J. // *Food Funct*. 2014. V. 5. № 10. P. 2632–2645.
21. Boly R., Gras T., Lamkami T., Guissou P., Serteyn D., Kiss R., Dubois J. // *Internat. J. Oncol*. 2011. V. 38. № 3. P. 833–842.
22. Huang C., Lee S.Y., Lin C.L., Tu T.H., Chen L.H., Chen Y.J., Huang H.C. // *J. Agric. Food Chem*. 2013. V. 61. № 26. P. 6430–6445.
23. Yu Z.J., He L.Y., Chen Y., Wu M.Y., Zhao X.H., Wang Z.Y. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2009. V. 25. № 8. P. 678–680.
24. Longva K.E., Pedersen N.M., Haslekas C., Stang E., Madshus I.H. // *Int. J. Cancer*. 2005. V. 116. № 3. P. 359–367.
25. Iselt M., Holtei W., Hilgard P. // *Arzneimittelforschung*. 1989. V. 39. № 7. P. 747–749.
26. Merlin J.L., Azzi S., Lignon D., Ramacci C., Zeghari N., Guillemin F. // *Eur. J. Cancer*. 1992. V. 28A. № 8–9. P. 1452–1458.
27. Reid G., Hubner M.R., Metivier R., Brand H., Denger S., Manu D., Beaudouin J., Ellenberg J., Gannon F. // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. № 3. P. 695–707.
28. Brufsky A.M. // *Breast Cancer (Auckl)*. 2014. V. 8. P. 109–118.
29. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A., Dressler L.G., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester M.A., Tse C.K., Edmiston S., et al. // *JAMA*. 2006. V. 295. № 21. P. 2492–2502.
30. Mai Z., Blackburn G.L., Zhou J.R. // *Mol. Carcinogenesis*. 2007. V. 46. № 7. P. 534–542.
31. Sakla M.S., Shenouda N.S., Ansell P.J., Macdonald R.S., Lubahn D.B. // *Endocrine*. 2007. V. 32. № 1. P. 69–78.
32. Way T.D., Kao M.C., Lin J.K. // *FEBS Lett*. 2005. V. 579. № 1. P. 145–152.
33. Seo H.S., Ku J.M., Choi H.S., Woo J.K., Jang B.H., Shin Y.C., Ko S.G. // *Anticancer Res*. 2014. V. 34. № 6. P. 2869–2882.
34. Seo H.S., Choi H.S., Kim S.R., Choi Y.K., Woo S.M., Shin I., Woo J.K., Park S.Y., Shin Y.C., Ko S.G. // *Mol. Cell Biochem*. 2012. V. 366. № 1–2. P. 319–334.
35. Sak K. // *Pharmacogn. Rev*. 2014. V. 8. № 16. P. 122–146.
36. Shukla S., Gupta S. // *Pharm. Res*. 2010. V. 27. № 6. P. 962–978.
37. Bilal I., Chowdhury A., Davidson J., Whitehead S. // *World J. Clin. Oncol*. 2014. V. 5. № 4. P. 705–712.
38. Kim S.H., Kim C.W., Jeon S.Y., Go R.E., Hwang K.A., Choi K.C. // *Lab. Anim. Res*. 2014. V. 30. № 4. P. 143–150.
39. Douglas C.C., Johnson S.A., Arjmandi B.H. // *Anticancer Agents Med. Chem*. 2013. V. 13. № 8. P. 1178–1187.
40. Lee W.J., Chen W.K., Wang C.J., Lin W.L., Tseng T.H. // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2008. V. 226. № 2. P. 178–191.
41. Seo H.S., Ju J.H., Jang K., Shin I. // *Nutr. Res*. 2011. V. 31. № 2. P. 139–146.
42. Ye Q., Kantonen S., Gomez-Cambronero J. // *J. Mol. Biol*. 2013. V. 425. № 4. P. 755–766.
43. Way T.D., Kao M.C., Lin J.K. // *FEBS Lett*. 2005. V. 579. № 1. P. 145–152.
44. Mafuvadze B., Benakanakere I., Hyder S.M. // *Menopause*. 2010. V. 17. № 5. P. 1055–1063.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, 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, рисунки 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.

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ



Что нового в области нанотехнологий?

узнай всего за 9600 рублей

9600 РУБЛЕЙ – ЦЕНА ГОДОВОЙ ПОДПИСКИ, ВКЛЮЧАЯ НДС

Подписка в редакции:

119234, Москва, Ленинские горы,

Научный парк МГУ, владение 1,

строение 75Б, офис 321

Телефон/ факс: +7 (495) 930 87 07

E-mail: nsoboleva@strf.ru

Web-site: www.nanoru.ru, www.nanorf.ru

Альтернативные агентства:

Урал-пресс www.ural-press.ru,

Информнаука www.informnauka.com

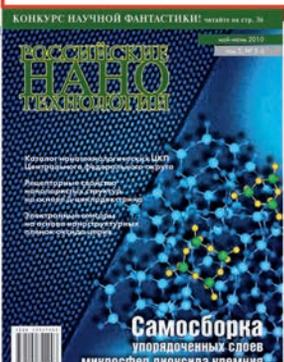
На электронную версию журнала можно подписаться через Научную электронную библиотеку: elibrary.ru



АКЦИЯ! ОДИН НОМЕР БЕСПЛАТНО читайте на стр. 112



НАМ 10 ЛЕТ



В России достаточно талантливых инженеров

Завершилась заочная экспертиза работ, поданных на конкурс индивидуальных исследовательских проектов, который проводится в рамках Всероссийского инженерного конкурса (ВИК). 15% работ признаны экспертами прорывными



В конкурсе индивидуальных исследовательских проектов участвуют проекты инженерной направленности, которые выполнены студентами, магистрантами и аспирантами, обучающимися по 20 направлениям подготовки, включая: информатику и вычислительную технику; электронику, радиотехнику и системы связи; фотонику, приборостроение, оптические и биотехнические системы и технологии; физико-технические науки и технологии; химические технологии; технологии материалов; авиационную и ракетно-космическую технику. Всего на конкурс подано более 1000 заявок от студентов и аспирантов, обучающихся в более чем 170 вузах, представляющих 9 федеральных округов России.

Заявки оценивались экспертной комиссией, в которую входят представители государственных корпораций, крупнейших промышленных предприятий, научного сообщества.

По оценкам членов экспертной комиссии 10-15% работ, поданных на конкурс индивидуальных исследовательских проектов ВИК, являются прорывными.

В сентябре на официальном сайте ВИК размещены списки участников, прошедших по результатам экспертизы в очный тур. По результатам экспертизы, всего в очном туре примут участие более 120 студентов. Итоги очного тура подведут в конце октября.

Напомним, что Всероссийский конкурс среди студентов и аспирантов образовательных и научных организаций Российской Федерации, обучающихся в сфере инженерного дела, технологии, технических наук в системе высшего образования (Всероссийский инженерный конкурс) - это система ежегодных профессиональных соревнований по выявлению лучших студентов, магистрантов и аспирантов, в части освоения профессиональных компетенций в инженерных областях. ВИК проводится ежегодно в соответствии с Поручением Президента России № Пр-349 от 13 февраля 2014 года.

Наряду с конкурсом индивидуальных исследовательских проектов в рамках ВИК проводятся инженерные состязания, организуемые предприятиями реального сектора экономики, общественными организациями и объединениями работодателей, олимпиады по инженерным дисциплинам или направлениям подготовки, а также инженерные конкурсы студенческих проектных коллективов, том числе на международном

уровне. «Инженерно-технологическое образование находится в сфере внимания Министерства образования и науки Российской Федерации. Мы всегда выделяем необходимое количество бюджетных мест для того, чтобы лучшие студенты могли учиться в ведущих университетах инженерно-технологического профиля», - отмечает заместитель министра образования и науки Российской Федерации Александр Климов необходимость эффективного развития инновационной составляющей (в ее инженерной части) российской системы высшего образования.

«Всероссийский инженерный конкурс, который мы начали проводить с прошлого года - было соответствующее поручение президента Российской Федерации, - имеет «зонтичный» характер. Для нас очень важно, чтобы в рамках этого конкурса были также отмечены те студенты и аспиранты, которые в рамках именно отраслевых конкурсов занимают ведущие позиции, демонстрируют лучшие проекты. <...>», - продолжает Александр Климов, поясняя актуальность Всероссийского конкурса и важность сотрудничества с ним предприятий реального сектора.

Через зонтичный характер конкурса, участие в нем инновационных компаний, госкорпораций и других работодателей создаются сети образовательных кластеров, где в каждом кластере объединены, под эгидой состязания, учреждения высшего профессионального образования, предоставляющие студентов для конкурса.

Презентация проектов (в рамках каждого кластера) независимым экспертам, способным указать на ошибки, и на основе своего опыта подсказать путь их исправления, является важным обучающим мероприятием, позволяющим будущим инженерам в доброжелательной среде смоделировать ситуации, которые ждут их в профессиональной карьере. А именно, обучающиеся улучшат свои презентационные навыки, которые так же необходимы в дальнейшей работе в качестве инженера, как и практические навыки.

Инженеры работают на реальных предприятиях, предлагающих продукцию, преимущество которой необходимо квалифицированно объяснить иностранным заказчиком. Таким образом, созданные в рамках зонтичного конкурса, сети образовательных кластеров будут способствовать повышению конкурентоспособности российского образования на рынке мировых образовательных услуг.