

Письмо редакторов

Уважаемые читатели *Acta Naturae*! Вашему вниманию предлагается 24-й номер нашего журнала – первый в 2015 г. Две дюжины номеров налицо – а мы по-прежнему живы и полны сил, портфель полон, IF растет! Это не хвастовство – скорее удивление и радость! В связи со всеми этими отрадными обстоятельствами Редакционный совет и Редакционная коллегия выражают глубокую благодарность всем нашим коллегам-энтузиастам, издающим журнал, и, прежде всего, нашим авторам, которые в свое время нам поверили и, смеем надеяться, верят и сейчас! Конечно, трудностей тоже немало, но надеемся, что с вашей помощью мы их преодолеем.

Но вернемся, однако, к текущему номеру. Журнал открывается четырьмя обзорами, все они в той или иной степени связаны с медициной. Первый из них (П.В. Сергиев и др.) посвящен теме, которая рано или поздно начинает волновать всех – теориям старения, во втором (К.Р. Валетдинова и др.) рассматриваются клеточные и животные модели заболеваний двигательных нейронов, а также обсуждаются проблемы, касающиеся использования клеточных технологий в биомедицинских целях. Третий

обзор (П.В. Пантелеев и др.) рассказывает нам об антимикробных пептидах – молекулярных факторах системы врожденного иммунитета, обеспечивающих универсальный и эволюционно древний способ защиты высших организмов от инфекции и являющихся основой для создания лекарственных препаратов нового типа. Наконец, четвертый обзор (Д.В. Попов и др.), посвященный, казалось бы, более «академической» теме – регуляции экспрессии изоформ белка PGC-1 α в скелетных мышцах, также имеет непосредственное отношение к медицине, точнее к физиологии, поскольку эта экспрессия прямым образом зависит от различных физиологических стимулов и фармакологических воздействий.

Научные сообщения номера посвящены весьма широкому спектру дисциплин – от классической биохимии до клеточной инженерии. Однако у них есть нечто общее – все посвящено исследованиям актуальных вопросов науки о живом и выполнены на современном уровне. Мы рады тому, что большая часть поступающих в редакцию статей отвечает этим критериям.

До новых встреч! ●

Редколлегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ



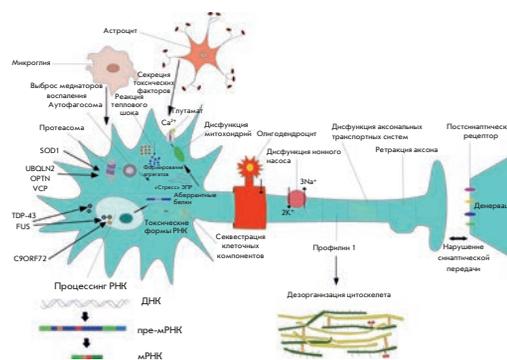
Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

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

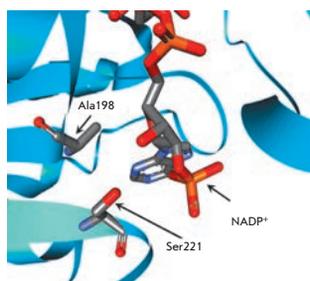
Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств

К. Р. Валетдинова, С. П. Медведев, С. М. Закиян

Обзор посвящен последним достижениям в области создания и изучения клеточных и животных моделей бокового амиотрофического склероза (БАС) и спинальной мышечной атрофии. Рассмотрены также основные проблемы, касающиеся использования клеточных технологий в биомедицинских целях.



Общая схема этиопатогенеза БАС



Фрагменты структур формилдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas sp. 101*

Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных формилдегидрогеназ

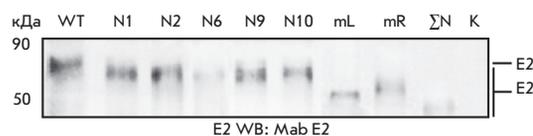
А. А. Алексеева, В. В. Федорчук, С. А. Зарубина, Э. Г. Садыхов, А. Д. Маторин, С. С. Савин, В. И. Тишков

Остатки Ala198 в NAD⁺-связывающем домене формилдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas sp. 101* и *Moraxella sp. C-1* (PseFDH и MorFDH соответственно) имеют неоптимальные значения углов ψ и φ. После введения замены A198G стабильность возросла в 2.5 раза, а значения K_m по NAD⁺ улучшились в 1.6 раза. Анализ кинетических свойств мутантных NADP⁺-специфичных PseFDH D221S и PseFDH A198G/D221S позволяют с высокой вероятностью сделать предположение, что ранее PseFDH была NADP⁺-, а не NAD⁺-зависимым ферментом.

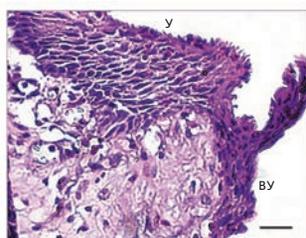
Роль гликозилирования белка E2 вируса гепатита С в функционировании белков оболочки вируса в клетках насекомых и млекопитающих

О. В. Орлова, В. Л. Друца, П. В. Спиринов, А. В. Иванов, В. С. Прасолов, П. М. Рубцов, С. Н. Кочетков, С. Н. Белжеларская

Исследовано влияние гликозилирования белка оболочки вируса гепатита С E2 на формирование гликопротеиновых комплексов и вирусных частиц в клетках насекомых и млекопитающих. Для этого в сайты N-гликозилирования E2 вводили точечные мутации и анализировали мутантные белки в клетках насекомых Sf9 и человека Hek293T. В отличие от Sf9, уровень синтеза E2 в Hek293T зависел от наличия гликозилирования в сайтах N1 и N8. Удаление гликанов в сайтах N1, N2 и N10 приводило к накоплению димеров E1E2 в виде агрегатов и подавлению продуктивной сборки вирусоподобных частиц.



Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в клетках Sf9



Поперечный срез восстановленного участка уретры кролика

Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи

О. С. Роговая, А. К. Файзулин, А. В. Васильев, А. В. Кононов, В. В. Терских

Живой эквивалент кожи исследован в качестве альтернативного источника пластического материала для закрытия полнослойных эпителиостромальных повреждений уретры. На примере восстановления уретры лабораторных кроликов изучена возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели *in vivo*. Показано, что кератиноциты кожи, помещенные в специфичное микроокружение *in vivo*, способны встраиваться в место дефекта и выполнять функции уротелия.

Acta Naturae

ТОМ 7, № 1 (24), ЯНВАРЬ—МАРТ 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. Шведас (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) 930 87 07.
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 11 марта 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: 0.872

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

Вехи мировой науки о живом 6

ОБЗОРЫ

П. В. Сергиев, О. А. Донцова, Г. В. Березкин
Теории старения. Неустаревающая тема ... 9

К. Р. Валетдинова, С. П. Медведев, С. М. Закиян
Модельные системы болезней двигательных
нейронов – платформа для изучения
механизмов патогенеза и поиска
терапевтических средств 21

П. В. Пантелеев, И. А. Болосов, С. В. Баландин,
Т. В. Овчинникова
Строение и биологические функции
β-спилочных антимикробных пептидов ... 39

Д. В. Попов, Е. А. Лысенко, И. В. Кузьмин,
О. Л. Виноградова, А. И. Григорьев
Регуляция экспрессии изоформ
PGC-1α в скелетных мышцах 51

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. А. Алексеева, В. В. Федорчук,
С. А. Зарубина, Э. Г. Садыхов, А. Д. Маторин,
С. С. Савин, В. И. Тишков
**Роль остатка Ala198 в стабильности
и коферментной специфичности
бактериальных форматдегидрогеназ 64**

О. С. Роговая, А. К. Файзулин, А. В. Васильев,
А. В. Кононов, В. В. Терских
**Реконструкция эпителия уретры кролика
с помощью кератиноцитов кожи 74**

О. А. Шадрина, Т. С. Зацепин, Ю. Ю. Агапкина,
М. Г. Исагулянц, М. Б. Готтих
**Сравнительный анализ влияния мутаций
лекарственной устойчивости на активность
интеграз ВИЧ-1 субтипов А и В 82**

О. В. Орлова, В. Л. Друца, П. В. Спирин,
А. В. Иванов, В. С. Прасолов, П. М. Рубцов,
С. Н. Кочетков, С. Н. Белжеларская
**Роль гликозилирования белка E2 вируса
гепатита С в функционировании белков
оболочки вируса в клетках насекомых
и млекопитающих. 92**

Д. В. Панкратов, Е. Гонзалез-Аррибас,
Ю. М. Парунова, М. А. Горбачева,
Ю. С. Зейфман, С. В. Кузнецов, А. В. Липкин,
С. В. Шлеев
**Новые нанобиоконструктивные материалы
для биоэлектронных устройств 103**

С. В. Дентовская, С. А. Иванов,
П. Х. Копылов, Р. З. Шайхутдинова,
М. Е. Платонов, Т. И. Комбарова,
Т. В. Гапельченкова, С. В. Балахонов,
А. П. Анисимов
**Избирательная протективность $\Delta nlpD$ -
мутантов *Yersinia pestis* 108**

А. В. Акимова, Г. Н. Рычков, М. А. Грин,
Н. А. Филиппова, Г. В. Головина, Н. А. Дурандин,
А. М. Виноградов, Т. А. Кокрашвили,
А. Ф. Миронов, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин
**Комплексообразование
с альбумином как фактор
фотодинамической активности новых
производных бактериопурпуринимида . . 116**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Л. А. Балабанова, В. А. Голотин, И. Ю. Бакунина,
Л. В. Слепченко, В. В. Исаков, А. Б. Подволоцкая,
В. А. Рассказов
**Рекомбинантная
 α -N-ацетилгалактозаминидаза
морской бактерии, модифицирующая
детерминанты А-эритроцитов 124**

Правила для авторов 128

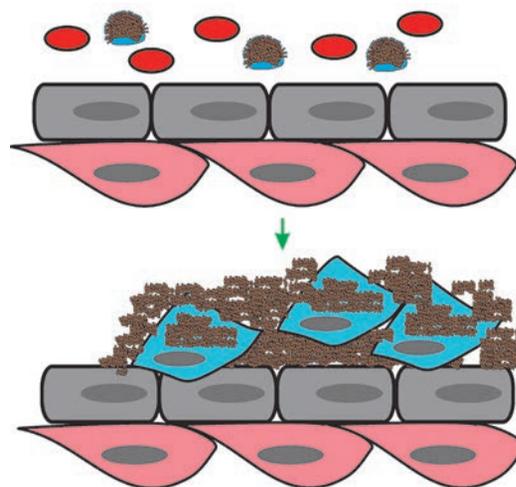


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью П.В. Сергиева и др.)

Вехи мировой науки о живом

Митохондриология и энергоснабжение клетки

Одним из важнейших направлений современной биохимии является детализация механизмов энергоснабжения клетки. Митохондрии давно признаны в качестве «электростанций» клетки. В 1961 году в журнале *Nature* Питером Митчеллом, будущим лауреатом Нобелевской премии, была опубликована революционная статья [1], заложившая основы хемиосмотической теории. Согласно этой теории, электрохимический потенциал протонов ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) играет важнейшую роль в производстве энергии митохондриями. В процессе дыхания происходит перенос протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство с образованием потенциала на их внутренней мембране. Именно этот, генерируемый дыханием, $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ используется H^+ -АТФ-синтазой для превращения ADP в АТФ. Митчелл предположил также, что разобщающие агенты типа динитрофенола, подавляющие синтез АТФ, не являются ингибиторами АТФ-синтазы, а их действие должно быть обусловлено рассеиванием мембранного потенциала – движущей силой синтеза АТФ. В то время подобная трактовка событий была революционной. Она вызвала огромный интерес со стороны ведущих ученых, многие из которых выражали скептическое отношение и предлагали свои гипотезы синтеза АТФ митохондриями. Большой вклад в развитие современной митохондриологии был сделан крупнейшим отечественным биохимиком В.П. Скулачевым. Сегодня редакция журнала решила посвятить раздел «Форум» краткому описанию основных вех развития этой увлекательной области.

В 1965 году Владимиром Петровичем Скулачевым был создан первый в мире отдел биоэнергетики в составе организованной А.Н. Белозерским Межфакультетской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии МГУ (ныне НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского). В эти годы в рамках хемиосмотической теории было начато изучение сопрягающей роли протонного потенциала в окислительном фосфорилировании. В 1967 году В.П. Скулачевым совместно с Е.А. Либерманом было получено одно из первых экспериментальных доказательств теории Митчелла [2]. Используя различные протонофоры, они обнаружили корреляцию между стимуляцией дыхания митохондрий, окисляющих сукцинат, и протон-

ной проводимостью двухслойной липидной мембраны. Для выяснения молекулярных механизмов, связывающих окислительное фосфорилирование с мембранным потенциалом митохондрий, была предпринята попытка найти ионы, способные проходить как через митохондриальную, так и через искусственные двухслойные плоские липидные мембраны. Такие органические ионы были найдены – наиболее эффективными оказались катион тетрафенилфосфоний (TPP^+) и тетрафенилборат-анион (TPB^-), отличающиеся центральным атомом, положительно заряженным в TPP^+ и отрицательно – в TPB^- . Использование этих соединений позволило показать, что митохондрии, энергизованные АТФ или в результате окисления субстратов, способны аккумуляиро-

вать катионы, а субмитохондриальные частицы – анионы [3]. Помимо важности результатов, полученных в этой работе, в научную литературу был впервые введен термин «протонофор», который с успехом используется по настоящее время. Эта публикация была воспринята научным сообществом с огромным интересом, и в признание ее важности разработанные ионы с легкой руки известного американского биохимика профессора Дэвида Грина были названы «ионами Скулачева» (Sk^+ и Sk^- , катионы и анионы соответственно) [4]. За эту работу В.П. Скулачеву в 1975 году была присуждена Государственная премия СССР.

В 90-е годы прошлого столетия в серии статей Х. Ванг [5–7] показал, что митохондрии участвуют в механизме запуска апоп-

тоза – программируемой гибели клеток, играющей важную роль в развитии организма и патологии при многих заболеваниях. Было установлено, что цитохром с, ключевая молекула дыхательной цепи, при определенных условиях может выйти из митохондрий и в цитозоле, объединившись с другими молекулами в апоптосомный комплекс, запустить один из механизмов апоптоза. Задолго до публикации работ Ванга при попытке поиска механизмов массовой гибели клеток под действием ионизирующей радиации было установлено подавление окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из радиочувствительных тканей (тимус и селезенка), которое, однако, отсутствовало в митохондриях, выделенных из радиорезистентных тканей печени [8, 9]. Подобные изменения окислительного фосфорилирования регистрировались уже через 30–60 мин после общего рентгеновского облучения крыс в относительно низких дозах (50–100 сГр) [10]. В радиочувствительных тканях подавление окислительного фосфорилирования коррелировало с образованием так называемых пикнотических ядер [11]. Более того, митохондрии, выделенные из радиочувствительных тканей после облучения, содержали меньшее количество цитохрома с по сравнению с митохондриями радиорезистентных тканей [12]. Впоследствии оказалось, что радиационное поражение приводит к ослаблению связывания цитохрома с с внутренней мембраной митохондрий, а добавление экзогенного цитохрома с может стимулировать окислительное фосфорилирование в митохондриях, выделенных из радиочувствительных тканей облученных крыс [9, 13]. Механизм данного феномена был установлен лишь в 2005 году [14]. Необходимо отме-

тить, что исследования механизмов радиационно-индуцированной гибели клеток очень активно велись в Советском Союзе. Именно отечественными учеными было постулировано и доказано, что радиационная гибель лимфоидных клеток является примером более широкого биологического феномена – программируемой гибели клеток [15, 16], что было признано мировой общественностью [17].

Одновременно с работами Ванга Г. Кремер показал, что падение мембранного потенциала митохондрий является одним из ведущих событий, запускающих гибель клеток [18]. В.П. Скулачев заинтересовался этим феноменом, подойдя к нему с совершенно неожиданной стороны, – он попытался найти связь между программируемой гибелью клеток и старением. Еще в конце 19 века А. Вейсманн высказал гипотезу, что в основе смерти, вызванной старением, лежит развитый в процессе эволюции адаптивный механизм [19]. Основываясь на данной гипотезе, Владимир Петрович предположил, что альтруистская смерть индивидуумов, являясь механизмом адаптации, может быть полезна для других групп организмов в окружающей среде. Он впервые ввел термин «феноптоз» и объяснил его как механизм очистки сообщества от нежелательных элементов [20]. Наипростейший пример феноптоза может наблюдаться у бактерий. У этих организмов альтруистская программируемая гибель необходима для: (а) предотвращения расширения инфицирования фагами популяции бактерий; (б) очистки популяции от клеток, геном которых или другие ключевые системы повреждены; (в) оптимизации числа бактериальных клеток в среде [21]. Впоследствии феномен феноптоза описали у дрожжей, у которых феромон-зависимая гибель подавлялась ингибиторами син-

теза белков и была признана программируемой [22]. Примеры феноптоза описаны и у некоторых высших организмов [21, 23], однако молекулярные механизмы, запускающие данный феномен, пока остаются неизвестными.

В эволюции постоянно репродуцирующихся организмов процесс старения должен быть более важным, чем «острый» феноптоз, так как функция зависимого от старения феноптоза заключается в снижении числа особей в популяции долгоживущих предшественников, стимулируя таким образом эволюцию. Другими словами, медленно развивающийся феноптоз усиливает данный процесс [24]. Что же может регулировать процесс зависимого от старения феноптоза? В.П. Скулачев предположил, что в основе данного механизма может лежать укорачивание теломер (подобный механизм был предсказан много лет назад отечественным ученым А.М. Оловниковым [25]). К сожалению, остается неизвестным, определяет ли укорачивание теломер продолжительность жизни всего многоклеточного организма или же это относится лишь к его определенным клеточным системам.

В последние годы опубликовано несколько принципиальных наблюдений, пытающихся на молекулярном уровне найти связь между старением и гибелью организма. Так, было показано, что продолжительность жизни животных, экспрессирующих и не экспрессирующих белок p66^{shc}, принимающий участие в регуляции уровня активных форм кислорода, различается на 30% [26]. Кроме того, хотя у мутантных мышей с повышенной активностью опухолевого супрессора p53 не наблюдается развитие опухолей, продолжительность их жизни короче, чем у мышей дикого типа [27]. Оба описанных белка активно участвуют в регуляции

апоптоза. Принимая во внимание эти наблюдения, В.П. Скулачев предположил, что продолжительность жизни можно будет регулировать согласованной активацией р53 и подавлением белка р66^{shc}. Будущее покажет, насколько возможно будет воспроизвести данное вполне логичное предположение в реальной жизни [23].

Накапливающиеся данные о механизмах программируемой гибели клеток и феномена фенотоза позволили Владимиру Петровичу высказать идею о «Правиле самураев» в биологии. Коротко это правило можно сформулировать так – «Лучше погибнуть, чем ошибиться». В одной из своих замечательных работ он

написал: «Любые биологические системы, начиная от органелл и кончая целым организмом, обладают программой самоуничтожения. Этот суицидный механизм активируется, когда система оказывается опасной для существования с другими системами в биологической иерархии» [21].

Развитие науки дает интересные примеры междисциплинарных пионерских прорывов, обеспеченных усилиями ученых разных стран, зачастую узнавших друг друга уже после публикаций их собственных приоритетных статей. История, рассказанная сегодня, является ярким примером этого. Владимир Петрович Скулачев познакомился с Питером

Митчеллом лишь в 1966 году на Конгрессе FEBS в Варшаве. Затем их связывала многолетняя дружба и общая любовь к митохондриологии. Эта область знания еще далеко не исчерпана, и особенно приятно, что у ее истоков были отечественные ученые. ●

**Б.Д. Животовский^{1,2},
В.Г. Гогвадзе^{1,2}, В.А. Ткачук¹**

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия
²Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitchell P. // Nature. 1961. V. 191. P. 144–148.
- Skulachev V.P., Sharaf A.A., Liberman E.A. // Nature. 1967. V. 216. № 5116. P. 718–719.
- Liberman E.A., Topaly V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. // Nature. 1969. V. 222. № 5198. P. 1076–1078.
- Green D.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1974. V. 346. № 1. P. 27–78.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. // Cell. 1996. V. 86. № 1. P. 147–157.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. // Cell. 1997. V. 90. № 3. P. 405–413.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. // Cell. 1997. V. 91. № 4. P. 479–489.
- Ashwell G., Hickman J. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952. V. 80. № 3. P. 407–410.
- Khanson K.P., Ivanova L.V. // Vopr. Med. Khim. 1969. V. 15. № 1. P. 64–66.
- van Bekkum D.W. // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 25. № 3. P. 487–492.
- van Bekkum D.W., de Vries M.J., Klouwen H.M. // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1965. V. 9. № 5. P. 449–459.
- Scaife J.F. // Can. J. Biochem. 1964. V. 42. P. 431–434.
- Manoilov S.E., Khanson K.P. // Vopr. Med. Khim. 1964. V. 10. P. 410–413.
- Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J.E., Bonzon C., Sullivan B.A., Green D.R., Newmeyer D.D. // Mol. Cell. 2005. V. 17. № 4. P. 525–535.
- Khanson K.P. // Radiobiologia. 1979. V. 19. № 6. P. 814–820.
- Umansky S.R. // J. Theor. Biol. 1982. V. 97. № 4. P. 591–602.
- Wyllie A.H. // ISI Atlas of Science: Immunology. 1988. V. 1. P. 192–196.
- Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J.L., Petit P.X., Kroemer G. // J. Exp. Med. 1995. V. 181. № 5. P. 1661–1672.
- Weismann A., Wenderoth M., Lounis S., Zahn P., Quaas N., Ulbrich R.G., Dederichs P.H., Blugel S. // Science. 2009. V. 323. № 5918. P. 1190–1193.
- Skulachev V.P. // Biochemistry (Moscow). 1997. V. 62. № 11. P. 1191–1195.
- Skulachev V.P. // Exp. Gerontol. 2001. V. 36. № 7. P. 995–1024.
- Severin F.F., Hyman A.A. // Curr. Biol. 2002. V. 12. № 7. P. R233–235.
- Skulachev V.P. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. V. 959. P. 214–237.
- Skulachev M.V., Severin F.F., Skulachev V.P. // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. № 10. P. 994–1003.
- Olovnikov A.M. // J. Theor. Biol. 1973. V. 41. № 1. P. 181–190.
- Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. // Nature. 1999. V. 402. № 6759. P. 309–313.
- Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., et al. // Nature. 2002. V. 415. № 6867. P. 45–53.

УДК 57.011

Теории старения. Неустаревающая тема

П. В. Сергиев^{1,2*}, О. А. Донцова^{1,2}, Г. В. Березкин³

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 3

³ЕСН группа, 123100, Москва, Рочдельская ул., 11/5, стр. 2

*E-mail: petya@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 29.08.2014

РЕФЕРАТ Интерес к теме старения не ослабевает на протяжении многих веков. Хотя современная медицина добилась значительного увеличения средней продолжительности жизни человека, старение остается во многом загадочным и, к сожалению, неизбежным процессом. Мы постарались кратко рассмотреть существующие теории и подходы к изучению старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активные формы кислорода, конечные продукты гликирования, накопление не утилизируемых отходов, продолжительность жизни, старение, теломераза.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует несколько устоявшихся теорий, объясняющих старение живых организмов, среди которых можно выделить две большие группы. Это теории, считающие старение специальной программой, и теории, полагающие, что старение связано с накоплением в организме тех или иных повреждений. Теории второй группы различаются тем, что предполагают существование различных источников и мишеней этих повреждений. Не обязательно, что одни теории исключают другие. Скорее всего, процесс старения у разных видов может протекать по-разному, а программируемое старение может включать ускоренное повреждение организма или отключение какой-либо системы борьбы с повреждениями. Какого рода повреждения могут вызывать процессы, связанные со старением?

МИТОХОНДРИИ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Основная функция митохондрий – дыхание, служащее главным источником энергии в клетке. В митохондриях органические вещества окисляются до воды и углекислого газа и синтезируется универсальный переносчик энергии, аденозинтрифосфат (АТФ). Митохондрии окружены двойной мембраной. Внешняя мембрана относительно проницаема для небольших молекул за счет специальных транспортных белков – поринов. Внутренняя мембрана образует складки – кристы, которые увеличивают поверхность мембраны. В процессе дыхания по раз-

ные стороны внутренней мембраны митохондрии формируется градиент концентрации ионов водорода (протонов) и трансмембранный потенциал. За формирование градиента концентрации протонов и трансмембранного потенциала отвечают белковые комплексы дыхательной цепи (I–IV), переносящие электроны от восстановительных эквивалентов – молекул NADH и FADH₂, на кислород. Одновременно с этим энергия окисления NADH и FADH₂ используется для перекачки ионов H⁺ из внутреннего пространства митохондрии (матрикса) в межмембранное пространство (рис. 1). Таким образом, межмембранное пространство митохондрии оказывается заряженным положительно, а матрикс – отрицательно. Запасенная энергия используется для синтеза АТФ другим трансмембранным белковым комплексом – АТФ-синтазой (рис. 2).

Одна из основных химических проблем дыхания – высвобождение слишком большой энергии в процессе окисления органических веществ (преобразованных в восстановительные эквиваленты NADH и FADH₂) кислородом. Задача дыхательной цепи состоит в том, чтобы разбить эту реакцию на небольшие промежуточные реакции, энергию которых легче использовать (превратить в протонный потенциал). Более того, на некоторых участках дыхательной цепи электроны переносятся попарно (как два восстановительных эквивалента), а на некоторых – по одному. На последней стадии восстановления молекулы кислорода до двух молекул воды комплексу

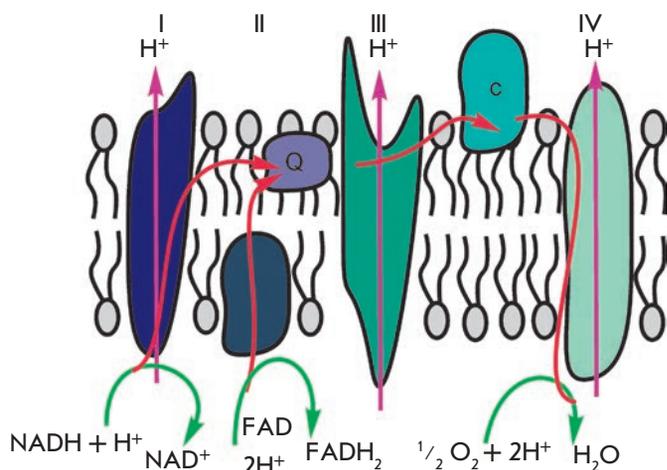


Рис. 1. Дыхательная цепь митохондрии. Показан процесс переноса электронов от NADH и FADH₂ на кислород

цитохром-с-оксидазы необходимо *последовательно* получить *четыре* электрона от восстановленной формы цитохрома с.

В процессе работы молекула кислорода восстанавливается, проходя последовательно через ряд таких промежуточных состояний, как супероксидный радикал (O₂⁻) и пероксид водорода. В большинстве случаев эти молекулы, называемые активными формами кислорода, остаются связанными с цитохром-с-оксидазой до полного превращения кислорода в воду. В отличие от упорядоченного восстановления кислорода цитохром-с-оксидазой, молекулы кислорода могут иногда неупорядоченным, случайным образом взаимодействовать с восстановленными компонентами дыхательной цепи в процессе переноса электронов и превращаться в высокореакционноспособные супероксидные радикалы. Источниками супероксидных радикалов служат в основном комплексы I и III дыхательной цепи. Кроме того, белок р66Shc может генерировать пероксид водорода, используя цитохром с [1, 2]. Короткоживущие активные формы кислорода способны повреждать практически любые биологические молекулы, в первую очередь компоненты митохондрий. Особенно опасны повреждения митохондриальной ДНК, приводящие к мутациям. Дело в том, что митохондрии имеют собственный небольшой геном, доставшийся им в наследство от прародительской бактерии, когда-то поглощенной клеткой предка эукариот. Этот геном кодирует в основном РНК-компоненты аппарата биосинтеза белка митохондрии и несколько компонентов дыхательной цепи. Геном митохондрий человека содержит гены двух рибосомных и 22 транспортных РНК, семи белков,

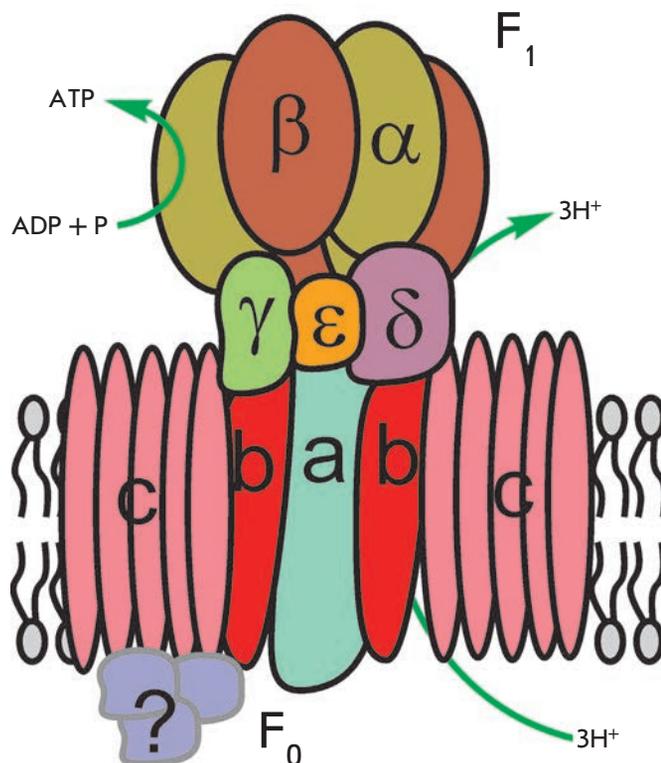


Рис. 2. Схема строения и функционирования АТФ-синтазы

входящих в состав дыхательного комплекса I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), одного белка дыхательного комплекса III (CYB), трех белков дыхательного комплекса IV (CO1, CO2, CO3) и двух белков, входящих в состав АТФ-синтазы (АТФ6, АТФ8). Большинство других белков, находящихся в митохондриях, кодируются основным ядерным геномом клетки.

Мутации в нескольких компонентах митохондрии могут изменить продолжительность жизни. Самый яркий пример, это инактивация гена COX5, кодирующего пятую субъединицу цитохром-с-оксидазы гриба *Podospora anserina* [3], приведшая к десятикратному увеличению продолжительности жизни. При этом гриб утрачивает способность к нормальному дыханию и переходит на альтернативную схему дыхания, возможную только у представителей ограниченного числа таксономических групп.

Клетки имеют свою систему борьбы с активными формами кислорода. Супероксидный радикал с помощью фермента супероксиддисмутазы (SOD) превращается в гораздо менее вредный пероксид водорода. В клетках человека есть митохондриальная марганецсодержащая супероксиддисмутаза (MnSOD)

и несколько цитоплазматических Cu,Zn-содержащих SOD. Пероксид водорода, который образуется из супероксидного радикала или в ходе других процессов, разлагается с помощью каталазы (CAT), пероксиредоксина (Prx) и глутатионпероксидазы (GPx). Пероксид водорода может самопроизвольно реагировать с ионом железа (II) в ходе так называемой реакции Фентона, в которой образуются высокорекреационноспособные гидроксильные радикалы (ОН), что представляет опасность для клетки.

Роль активных форм кислорода как основного источника повреждений не только самих митохондрий, но и других компонентов клеток при старении была выдвинута Д. Харманом в 1956 г. [4] и до сих пор остается одной из самых популярных. Снижение количества активных форм кислорода с помощью специально сконструированных возобновляемых антиоксидантов легло в основу предложенного В.П. Скулачевым метода борьбы с возрастными заболеваниями [5]. Надо сказать, что в настоящее время идея участия активных форм кислорода в повреждениях, связанных со старением, подверглась, как минимум, ряду модификаций. Изначально считалось, что повреждения митохондрий постепенно приводят к увеличению продукции активных форм кислорода такими дефектными митохондриями и, следовательно, к ускорению процесса старения [6]. Однако оказалось, что большинство дефектов, обнаруживаемых в митохондриях, не повышают продукцию активных форм кислорода, а полностью инактивируют митохондрии, поэтому и возникла теория о токсичности клеток, лишенных функциональных митохондрий, для всего организма [7].

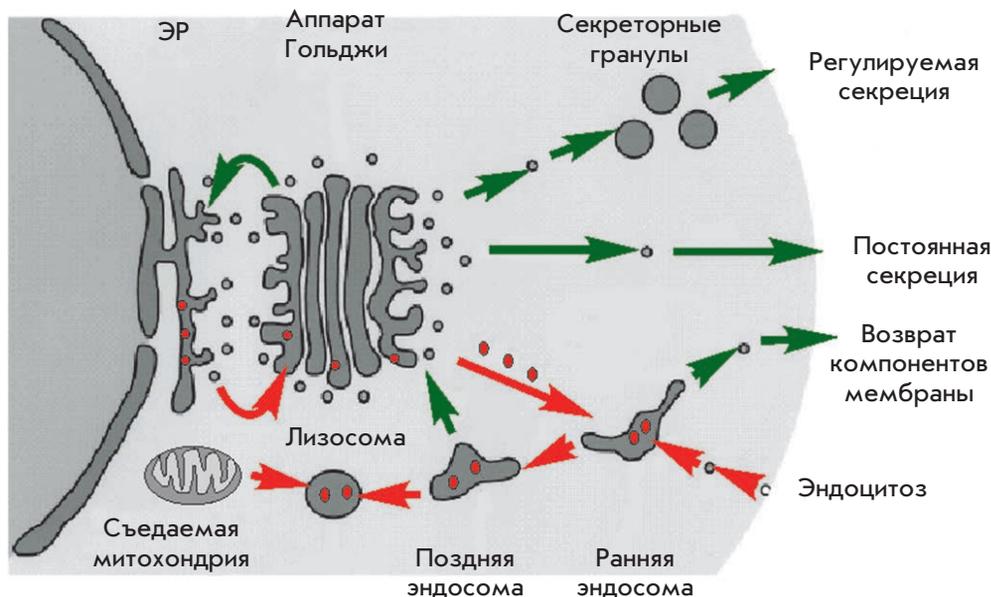
Не все исследователи соглашались с тем, что активные формы кислорода служат основным источником повреждений организма, связанных со старением, а также с отрицательной ролью активных форм кислорода. У многих животных количество активных форм кислорода обратно коррелирует с продолжительностью жизни [8], однако экспериментально показано, что у грызуна *Heterocephalus glaber* (голый землекоп), который отличается исключительно высокой продолжительностью жизни, уровни активных форм кислорода и окислительных повреждений гораздо выше, чем у мыши (*Mus musculus*), живущей намного меньше [9]. Известно, что активные формы кислорода играют важнейшую роль в работе иммунной системы, межклеточном общении и стрессовом ответе (см., например, обзор [10]). Отдельного внимания заслуживает связь системы инактивации активных форм кислорода со старением. Хотя кажется очевидным, что чем лучше работает система защиты от активных форм кислорода, тем выше должна быть продолжительность жизни, на самом деле это

не так. Наоборот, найдена отрицательная корреляция между содержанием ферментов, инактивирующих активные формы кислорода, и продолжительностью жизни у млекопитающих [8]. В то же время искусственное повышение количества ферментов, инактивирующих активные формы кислорода в клетках, привело к увеличению продолжительности жизни. Положительный эффект оказывало введение с помощью генетических манипуляций дополнительного количества каталазы в митохондрии, но не в ядро клеток мышей [11]. Увеличивала продолжительность жизни мухи сверхэкспрессия CuZnSOD [12]. С другой стороны, делеция ряда генов, инактивирующих активные формы кислорода, не влияла на продолжительность жизни нематоды *Caenorhabditis elegans*, а делеция гена *sod-2* даже увеличивала ее [13].

Таким образом, по-видимому, активные формы кислорода могут участвовать в повреждении клеток, в первую очередь митохондрий, при старении, но при этом играть положительную роль в других процессах.

НАКОПЛЕНИЕ НЕУТИЛИЗИРУЕМЫХ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Следующая теория, объясняющая старение, – накопление различного рода химических веществ, которые не могут быть переработаны организмом. В общем виде эта теория очень хорошо сформулирована в ряде работ В. Гладышева [14, 15], а ее отдельные стороны разбираются в других работах [16]. Предполагается, что вследствие фундаментальной неидеальности химических и, в частности, ферментативных превращений в процессе метаболизма в клетках протекают побочные реакции. Чем более сложен и интенсивен метаболизм, тем больше типов побочных продуктов этих реакций появляется в клетках. Некоторые из этих продуктов легко покидают клетки, а некоторые утилизируются специальными ферментами. Для утилизации каждого побочного продукта должен существовать свой фермент, а возможно, и несколько, что, в свою очередь, еще больше усложняет метаболизм и приводит к еще большему разнообразию побочных продуктов. Различные организмы имеют разные наборы ферментов, разлагающих побочные продукты метаболизма. Как правило, их не слишком много, и они работают только с самыми часто возникающими и самыми токсичными из них. Остальные побочные продукты просто накапливаются в клетках. Единственный и универсальный способ борьбы с такими веществами – их разбавление в процессе клеточного деления. Этот метод успешно работает, но только для клеток, которые делятся. Проблема многоклеточных организмов, таких, как человек, со-



- Ферменты лизосом, «отмеченные» маннозо-6-фосфатом.

Рис. 3. Транспорт в лизосомы. Показана система везикулярного транспорта клетки. Красными стрелками показаны пути, ведущие в лизосому с поверхности клетки («пища», поступающая извне), из цитоплазмы клетки (например, нефункциональная митохондрия, которую необходимо переработать) и из эндоплазматического ретикулума (ферменты лизосомы)

стоит в том, что множество групп клеток прекращает делиться или делиться очень медленно, но не перестает участвовать в метаболизме. В таких клетках, в число которых входят жизненно важные клетки сердца и головного мозга, накапливаются побочные продукты метаболизма, постепенно начинающие мешать их нормальному функционированию. Основным внутриклеточным побочным продуктом такого рода, возможно, является так называемый липофусцин – сложная смесь веществ, накапливающихся в лизосомах. Лизосомы – это внутриклеточные органеллы, в которых происходит расщепление как питательных веществ, поступающих извне, так и внутриклеточных структур, которые необходимо переработать. Кроме того, в лизосомы поступают пищеварительные ферменты, принадлежащие к классу гидролаз. Эти ферменты транспортируются в лизосому с помощью системы везикулярного транспорта через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Для того чтобы попасть в лизосомы, лизосомальные гидролазы маркируются специальными ярлыками – остатками маннозо-6-фосфата (рис. 3). Лизосомальные ферменты активируются и работают только при понижении pH (закислении) среды внутри лизосомы. Накопление липофусцина в лизосомах приводит к разбавлению ферментов и препятствует закислению лизосом, что постепенно снижает эффективность работы кислых гидролаз. У разных организмов

имеются различные наборы лизосомальных ферментов, а также ферментов, утилизирующих побочные продукты метаболизма в других частях клетки.

Неутилизируемые побочные продукты метаболизма накапливаются не только внутри, но и вне клетки. Среди внеклеточных продуктов, характерных для человека, можно упомянуть накапливающиеся в кровеносных сосудах бляшки, содержащие холестерин и продукты его окисления, а также полимеризованные фрагменты белков, таких, как β -амилоид в нервной ткани. В состав атеросклеротических бляшек входят липиды, осевшие на стенках кровеносных сосудов. В первую очередь, это окисленные и гликозилированные формы холестерина, но имеются и другие липиды. Основным переносчиком липидов в кровотоке являются липопротеины низкой плотности (LDL), из которых липиды и попадают на стенки сосудов (рис. 4А).

С атеросклеротическими бляшками взаимодействуют клетки иммунной системы – моноциты, превращающиеся в макрофаги. Эти клетки поглощают содержимое бляшек и до определенного момента играют положительную роль. Однако в некоторых случаях сами макрофаги начинают накапливаться в материале бляшек, образуя наполненные липидами пенистые клетки (рис. 4Б). Сравнение полиморфизмов ДНК у столетних французов и в контрольной группе с помощью так называемого полногеномно-

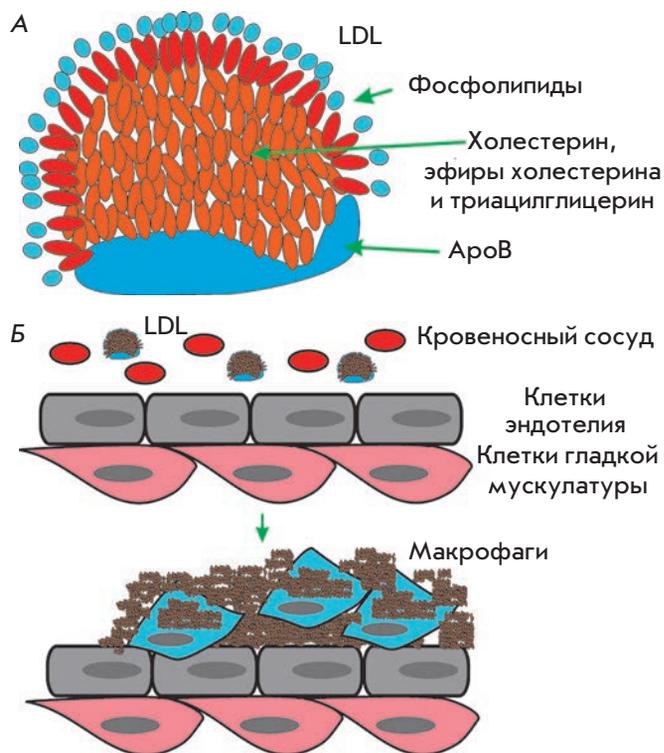


Рис. 4. Схема строения липопротеида низкой плотности (LDL), основного переносчика липидов в кровотоке (А), и формирование атеросклеротической бляшки (Б)

го анализа ассоциаций (GWAS) показало, что один из вариантов ApoE (аллель E2), компонент липопротеинов очень низкой плотности, преобладает в популяции долгожителей, в то время как вариант E4, связанный с повышенным риском атеросклероза, у них практически не встречается [17]. При этом ассоциации полиморфных вариантов основного белкового компонента липопротеинов низкой плотности, ApoB, с долгожительством не обнаружено.

Второй тип токсичных продуктов, накапливающихся преимущественно в нервной ткани, это амилоидные белки. Наиболее известен так называемый β -амилоид, вызывающий болезнь Альцгеймера (см., например, обзор [18]). Он образуется из важного и безобидного белка, называемого предшественником β -амилоида, в результате вырезания центральной части предшественника β - и γ -секретазами (рис. 5). Белок β -амилоида может иметь несколько вариантов пространственной структуры, один из которых, содержащий β -листы, токсичен. Эта токсичность связана с полимеризацией β -амилоида. Более того, полимерная форма β -амилоида способствует переходу структуры мономеров в состояние, необходимое для полимеризации. Полимеризованный β -амилоид

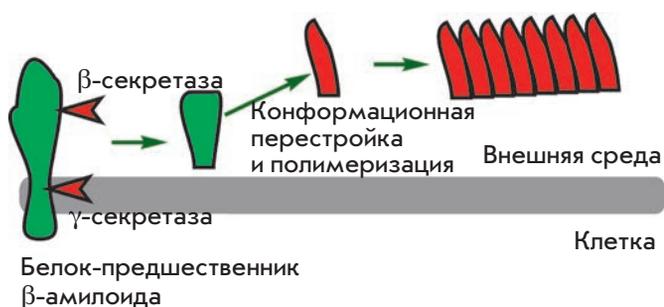


Рис. 5. Образование β -амилоида и его полимеризация

образует сенильные бляшки в головном мозге и вызывает болезнь Альцгеймера. Имеются сведения, что β -амилоид претерпевает самопроизвольные химические превращения, такие, как образование пироглутаминовой кислоты, способствующие образованию токсичной полимеризованной формы [19]. Кроме β -амилоида есть и другие белки и пептиды, способные самопроизвольно полимеризоваться с образованием токсичных нерастворимых структур. Возможно, для этого процесса важна также самопроизвольная химическая модификация белков, что позволяет относить образование подобных структур к побочным продуктам метаболизма.

Наконец, к побочным продуктам метаболизма в некоторой степени можно отнести белки, подвергшиеся процессу самопроизвольной модификации и сшиванию молекулами сахаров, в основном глюкозы. Процесс гликирования начинается с взаимодействия аминокислотных остатков лизина и альдегидных групп глюкозы (рис. 6), которое приводит к образованию оснований Шиффа. Затем, после перегруппировки двойной C=N-связи, получают так называемые продукты Амадори и, наконец, с помощью нескольких различных механизмов могут образоваться разнообразные конечные продукты гликирования, например глюкозепан.

Главным следствием самопроизвольного гликирования считается нарушение эластичности тканей, что особенно важно для кровеносных сосудов [20]. Кроме того, самопроизвольное гликирование нарушает функции белков. Этот процесс хорошо иллюстрирует концепцию накопления побочных продуктов метаболизма, приводящую к старению. Пока неизвестны ферменты, позволяющие расщеплять продукты гликирования. Избежать самопроизвольного гликирования скорее всего невозможно, поскольку все белки содержат остатки лизина, а глюкоза – один из основных метаболитов всех живых организмов. FAD-зависимые дегликирующие фер-

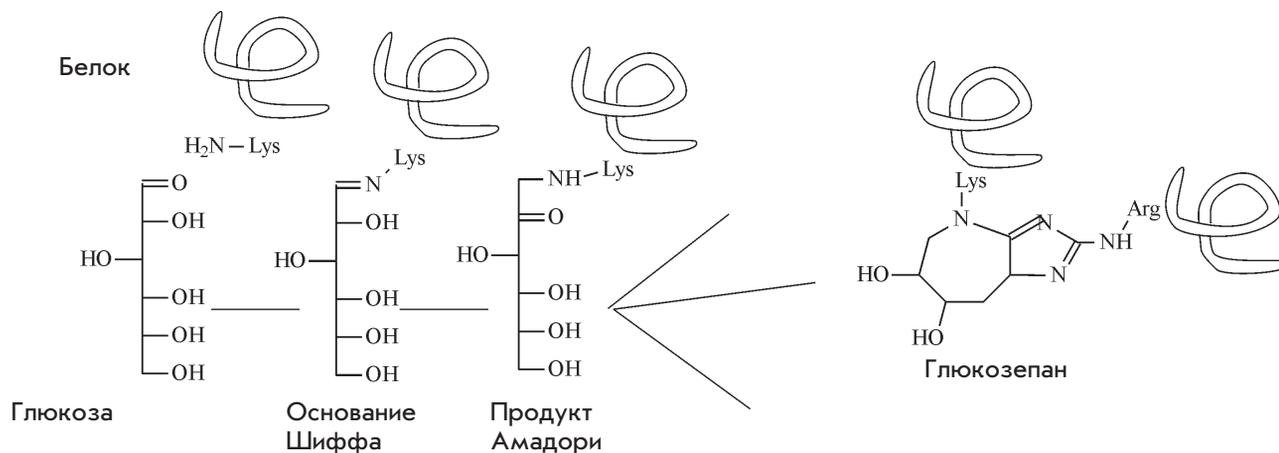


Рис. 6. Самопроизвольное гликирование белков

менты найдены у грибов (амадориаза) и бактерий (фруктозолизин-6-киназа *frlD* и фруктозолизин-6-фосфат-дегликаза *frlB*) [21], но они действуют только на низкомолекулярные вещества – конъюгаты аминокислот с сахарами, и непригодны для дегликирования белков. У позвоночных также найдены ферменты фруктозамин-3-киназа (FNЗК) и сходный с ней белок (FNЗК-РР), способные расщеплять продукты гликирования, но они нуждаются в АТФ и поэтому могут работать только внутри, но не снаружи клеток.

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СТАРЕНИИ

Старение связано не только с накоплением побочных продуктов метаболизма, но и с различного рода нарушениями регуляторных механизмов. Например, известно, что с возрастом часто нарушается баланс между про- и противовоспалительными системами, приводя к развитию хронического воспалительного процесса. Причинная связь между таким воспалением и развитием старческих заболеваний постулируется теорией воспалительного старения Франчески [22]. При этом повышенная склонность к воспалительным реакциям в раннем возрасте, обеспечивающая защиту организма от инфекций, играет отрицательную роль в преклонном возрасте.

Помимо нарушения баланса воспалительной и противовоспалительной реакции, при старении возможно повреждение еще нескольких важных регуляторных систем организма. Так, российский ученый В.М. Дильман выдвинул нейроэндокринную (элевационную) теорию старения [23]. Эта теория опирается на существование в организме саморегулирующихся гомеостатических систем – систем с отрицательной обратной связью, одна из важнейших среди которых – гипоталамо-гипофизарно-над-

почечниковая система. Повышение порога чувствительности гипоталамуса к регуляторным сигналам обратной связи лежит в основе сразу нескольких неблагоприятных возрастных изменений в организме человека, в частности, в выключении репродуктивной функции [24]. Разработка и экспериментальное подтверждение элевационной теории старения являются важнейшим достижением отечественной науки о старении.

ТЕЛОМЕРЫ – БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ КЛЕТКИ

ДНК эукариотических клеток находится в составе хромосом в линейной двухцепочечной форме. Число хромосом у разных видов может варьировать от одной до нескольких сотен. На концах таких линейных молекул есть специальные ДНК-белковые комплексы, называемые теломерами. Теломеры защищают хромосомы от повреждения и слияния. Они позволяют клетке отличать нежелательные случайные двухцепочечные разрывы ДНК, вызванные внешними причинами, например радиацией, от нормальных концов хромосом. Линейное строение хромосом порождает впервые сформулированную А.М. Оловниковым проблему репликации концов ДНК [25], которая заключается в том, что для начала репликации ДНК необходима РНК-затравка (праймер). После репликации праймер удаляется. Удаление праймера приводит к тому, что с каждым делением клетки хромосомы будут немного укорачиваться. Оловников предположил, что в клетке должен существовать особый фермент, удлиняющий теломеры. Через много лет такой фермент, названный теломеразой, был найден экспериментально [26].

Оказалось, что теломераза активна не во всех клетках организма. Клетки, которые могут делиться бесконечно, т.е. половые и стволовые, способны

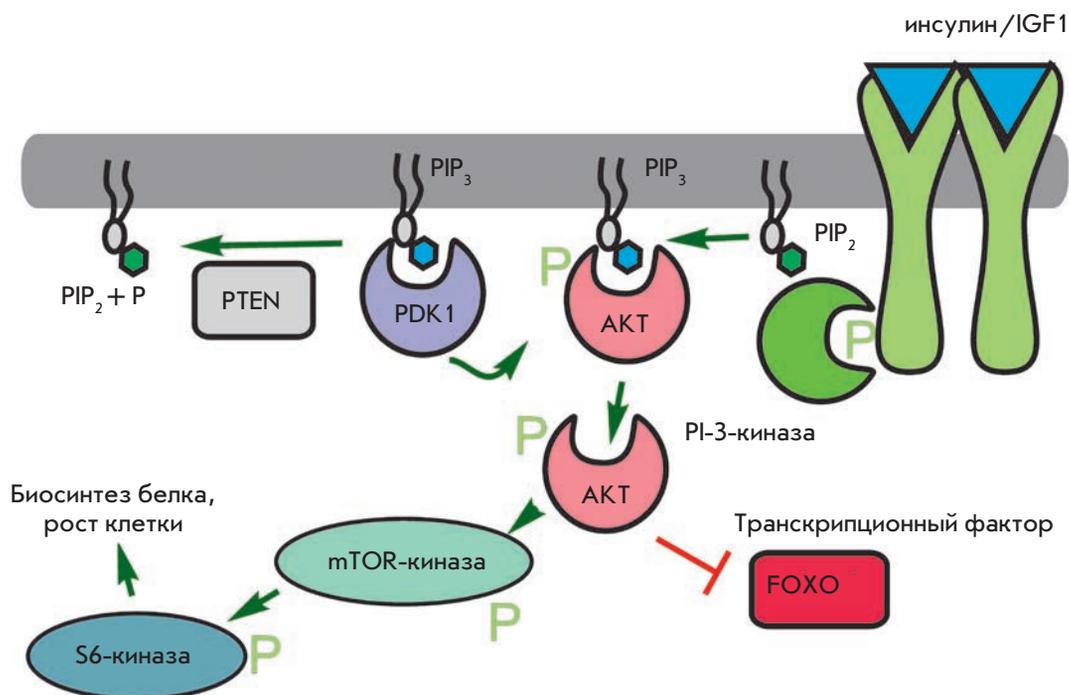


Рис. 7. Упрощенная схема сигнального пути инсулина/инсулиноподобного фактора роста

удлинять свои теломеры с помощью теломеразы. Большинство других клеток организма могут делиться только ограниченное число раз или не делиться вообще. В таких клетках нет активной теломеразы. При делении клеток, лишенных теломеразы, теломеры сокращаются [27]. Это сокращение объясняет ранее открытый феномен ограниченного числа делений соматических клеток в культуре [28]. Таким образом укорочение теломер может считаться своеобразными часами, отсчитывающими время деления клеток. Достаточно заманчивой представляется возможность переноса клеточных биологических часов на весь организм, если предположить, что активация теломеразы в соматических (не половых) клетках может обеспечить неограниченную продолжительность жизни. Тем не менее такой прямолинейный подход чреват большими проблемами. Дело в том, что отключение теломеразы в основной массе клеток многоклеточного организма рассматривается как своеобразный механизм защиты от возникновения раковых опухолей [29]. Даже если клетки приобретут набор мутаций, позволяющий им делиться независимо от путей, ограничивающих деление, в отсутствие теломеразной активности число клеточных делений все равно будет небольшим. Для образования большинства злокачественных опухолей требуются дополнительные мутации, активирующие теломеразу, или мутации, делающие деление нерегулируемым, которые должны возникнуть в небольшой доле клеток с активной теломеразой. Из-за действия этого

механизма раковые клетки возникают не так часто, как в присутствии активной теломеразы во всех клетках. Таким образом, существует своеобразный компромисс между полезным обновлением клеток и возникновением раковых опухолей. Слишком малая доля клеток, имеющих активную теломеразу, привела бы к недостаточному обновлению клеток, тогда как слишком большая увеличила частоту злокачественной трансформации.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВРЕМЯ И ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА

Давно известно, что к увеличению продолжительности жизни модельных животных приводит ограничение калорийности питания. Этот эффект был открыт Маккеем в опытах на мышах в тридцатые годы прошлого столетия [30]. С тех пор обнаружили множество мутаций, связанных с интенсивностью метаболизма, которые увеличивают продолжительность жизни модельных организмов. Основные работы на эту тему выполнены на нематоде *C. elegans*, избранном объекте биологии развития. Этот небольшой организм имеет считанное, всегда одно и то же число клеток, причем известна судьба каждой клетки. Некоторые мутации вдвое увеличивают продолжительность жизни *C. elegans* [31], в норме равную 20 дням. Мутации в генах, повышающие продолжительность жизни нематоды, подробно рассмотрены [32]. Подавляющее большинство мутаций, значительно увеличивающих время жизни нематоды, влияет

на интенсивность метаболизма. У нематоды есть специальная программа развития, которая включается в крайне неблагоприятных условиях голодания.

Эта программа, называемая *dauer* (длительный, затяжной), включает замедление метаболизма и развития личинок, а также ограничение питания, не говоря уже о полной остановке полового созревания. В таком состоянии, более всего напоминающем спячку, нематода может пережить периоды недостатка пищи, при этом продолжительность ее жизни значительно увеличится. Поскольку состояние *dauer* в норме вызывается голоданием личинки нематоды, этот путь очень сходен с увеличением продолжительности жизни других модельных организмов при ограничении калорийности рациона. Существенная разница состоит в том, что у более высокоорганизованных организмов нет специальной программы развития организма, связанной с голодом.

Ген *daf-2*, мутация в котором приводит в двукратному увеличению продолжительности жизни нематоды, является гомологом гена рецептора инсулина [33]. Другие мутации, способствующие увеличению продолжительности жизни, также указывают на участие сигнальных путей инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF1) (рис. 7). Эти сигнальные пути включаются при обилии питательных веществ, в первую очередь глюкозы, приводят к интенсификации метаболизма, способствуют росту и делению клеток. Мутации, увеличивающие продолжительность жизни, встречаются в генах белков, находящихся в разных частях этого сигнального каскада. Фосфоинозит-3-киназа (*age-1*) переносит сигнал от субстрата рецептора инсулина (IRS) на киназы PDK и Akt, которые, в свою очередь, передают его на систему биосинтеза белка и меняют транскрипционную программу клеток при посредничестве фактора транскрипции FOXO (*daf-16*). Еще один важный компонент программы контроля метаболической и ростовой активности – гистондеацетилаза Sir2. Деацетилирование гистонов приводит к «умолчанию» генов. Повышенная экспрессия Sir2 увеличивает продолжительность жизни, а у нематод с делецией этого гена ограничение калорийности рациона перестает влиять на продолжительность жизни [34].

Картированы также несколько генов, мутации в которых увеличивают продолжительность жизни мухи *Drosophila melanogaster* [32]. Анализ этих генов показывает, что в этом случае значительное увеличение продолжительности жизни также связано с мутациями в системе передачи сигнала от инсулина и инсулиноподобного фактора роста, а также с мутациями, затрагивающими интенсивность метаболизма и влияющими непосредственно на цикл Кребса. Практически такой же спектр регуляторных систем

клетки изменяется и при мутациях, увеличивающих продолжительность жизни мышей [32]. Среди генов, влияющих на продолжительность жизни, мы находим также гены системы передачи сигнала от инсулина и инсулиноподобного фактора роста, а также гены, кодирующие компоненты систем ответа на стресс.

Таким образом, анализ мутаций, увеличивающих продолжительность жизни нескольких модельных организмов, приводит нас к концепции биологического времени, которое, по сути, является функцией времени и интенсивности метаболической активности. В полном соответствии с концепцией В. Гладышева и другими теориями старения метаболизм служит основным источником побочных продуктов химических реакций, которые не могут быть переработаны организмом и накапливаются. Чем интенсивнее работает метаболизм, тем быстрее накапливаются токсичные побочные продукты и повреждения. Наоборот, замедление метаболизма, будь то в результате простого ограничения калорийности рациона или мутаций, влияющих на сигнальные пути, чувствительные к избытку питательных веществ, увеличивает продолжительность жизни за счет меньшей скорости накопления токсичных побочных продуктов.

Механизмы повреждений, связанные с нормальным метаболизмом, также взаимосвязаны. В первую очередь, это образование активных форм кислорода, приводящее к окислению компонентов клетки, и гликирование компонентов клетки, связанное с основным метаболитом – глюкозой. Продукты окислительного повреждения и гликирования приводят к отложению липофусцина в лизосомах, снижению эластичности сосудов и способствуют отложению нерастворимых продуктов как на стенках сосудов, так и в нервной ткани.

СТАРЕНИЕ КАК ПРОГРАММА

Хотя многие молекулярные механизмы старения известны и похожи на неизбежное накопление токсичных побочных продуктов метаболизма или вызванных ими повреждений, существуют теории, склонные считать старение программой. Впервые гипотеза программируемого старения была опубликована А. Вейсманом [35]. В последние годы получила широкую известность модификация этой теории, выдвинутая В. Скулачевым [36]. Известна также теория программируемого старения А. Бойко [37]. При этом теории программируемого и самопроизвольного старения часто сходятся в своих молекулярных механизмах.

Какие аргументы выдвигают сторонники теорий программируемого старения? Во-первых, это су-

ществование видов, старение которых происходит внезапно. В этом случае мы определенно имеем дело с программой. Практически всегда такое быстрое старение включается после программы полового размножения. Так, бамбук размножается вегетативно и может расти 15–20 лет без видимых признаков старения. Однако после цветения и созревания семян он быстро вянет, давая таким образом возможность семенам порости. Наиболее известный пример быстрого старения – лосось. Тихоокеанские лососи заходят из моря в реки, где нерестятся, после чего у них значительно повышается уровень глюкозы, жирных кислот и холестерина, усиливается работа надпочечников, и они погибают. Пример отмены этой программы открыт российским биологом В.В. Зюгановым [38]. Личинка моллюска жемчужницы, паразитирующая на лососе, отменяет программу ускоренного старения для того, чтобы иметь возможность созреть. Хотя отмена программы старения лосося не бесспорна [39], не вызывает сомнений сам факт ускоренного запрограммированного старения. Известно еще несколько примеров очевидной программы смерти, чаще всего связанной с размножением, в том числе гибель самцов австралийской сумчатой мыши [40], поденок после размножения и откусывание головы самца самкой богомола после копуляции. Эти события явно носят характер запрограммированной гибели, однако их связь со старением не всегда очевидна. Тем не менее эти примеры иллюстрируют возможность существования программ, разрушительных для индивида, ради выживания популяции. В своей теории старения В. Скулачев [36] постулирует, что старение млекопитающих – это такая же разрушительная программа, только развивается она не так стремительно и реализуется через продукцию активных форм кислорода и гибель митохондрий.

Достаточно очевидно, что среднее время жизни у представителей определенного вида животных так или иначе запрограммировано в геноме. Тем не менее различные теории расходятся в том, является ли старение целью или «побочным результатом» генетических программ. Например, согласно широко известной теории расходуемой сомы Т. Кирквуда [41], старение – это компромисс в распределении ограниченных ресурсов между поддержанием и восстановлением тканей индивида и другими процессами, способствующими выживанию вида. Проявление этого компромисса наблюдается, например, при сравнении средней продолжительности жизни сходных видов животных, имеющих различную вероятность гибели от хищников. Когда вероятность гибели велика, замедление старения не дает тех эволюционных преимуществ, которые может дать, например, быстрое размножение. Согласно теории А. Бойко [37],

старение – это приобретенная программа. Предки многоклеточных животных и многие таксономические группы живущих ныне многоклеточных лишены этой программы. Старение, как таковое, закодировано в геноме как путь развития организма, включающий образование невозобновляемых, так называемых постмитотических тканей. Клетки этих тканей не делятся сами и не могут пополняться из запаса стволовых клеток. В таком виде теория Бойко интегрирует теорию накопления побочных продуктов метаболизма В. Гладышева [15] и является достаточно стройной.

ОПЫТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Программа старения явно или неявно задана в геноме, теоретически ее можно выявить, сравнивая геномы стареющих и не стареющих организмов. При этом организмы должны быть достаточно сходными, чтобы их геномы содержали минимальное число различий, не связанных со старением. Даже сравнение индивидуальных геномов одного вида, полученных от долгожителей и контрольной группы, не всегда информативно. Опубликовано достаточно много работ, в которых анализируются ассоциации между продолжительностью жизни и мутациями (полиморфными вариантами) генов, основная проблема которых – их статистическая значимость. Современные исследования такого рода включают в себя анализ нескольких тысяч образцов ДНК как в контрольной группе, так и в группе долгожителей. Пока только один ген, *APOE*, показал ассоциацию с долгожительством со статистической значимостью $p < 5 \times 10^{-8}$ [42]. Среди ассоциаций, обладающих меньшей значимостью, можно назвать компоненты сигнального пути инсулина/IGF1 (*AKT1*, *AKT3*, *FOXO4*, *IGF2*, *INS*, *PIK3CA*, *SGK*, *SGK2*, *YWHAG*) и теломеразы (*POT1*) [43]. Гены, мутации в которых ассоциированы с долгой жизнью, подробно рассмотрены в недавнем обзоре Ньюман [44].

Сравнение геномов долгоживущих представителей одного вида и контрольной выборки позволяет выявлять гены, влияющие на продолжительность жизни, но имеет ряд особенностей. Положительной стороной подобного подхода является использование больших выборок индивидов с очень сходными геномами. Это позволяет с достаточно большой статистической значимостью выявлять мутации, которые влияют на изучаемый признак, и отличать их от случайных мутаций. В геноме человека размером 2.9×10^9 нуклеотидов содержится несколько миллионов индивидуальных вариабельных (полиморфных) участков [45]. С помощью таких инструментов, как микрочипы, стало возможным анализировать до 1 000 000 по-

добных участков у каждого индивида. Именно из-за столь большого числа различий статистически значимыми считают различия при $p < 10^{-8}$. Тем не менее основной недостаток анализа геномов с целью поиска генов, ассоциированных с долгожительством человека, – не слишком большая вариабельность продолжительности жизни. Сравнивая геномы разных видов, можно, теоретически, выявлять гены, связанные с гораздо большим (в разы) увеличением продолжительности жизни. Продолжительность жизни животных может отличаться до 10 000 раз. Так коловратки живут несколько дней, а гренландский кит до 200 лет. Сравнение геномов видов с различной продолжительностью жизни связано с дополнительными трудностями. Даже у представителей одного вида геномы имеют миллионы различий. Геномы разных видов отличаются настолько, что их довольно сложно, если вообще возможно, сравнивать.

Только у организмов, разительно отличающихся как строением, так и размерами тела, продолжительность жизни может отличаться в 10 000 раз. Сравнивать геномы коловратки и кита в поисках генов, регулирующих продолжительность жизни, достаточно бесперспективно. Вообще, размеры тела сказываются на продолжительности жизни очень сильно [46].

Разумным подходом к генетическому анализу продолжительности жизни может служить сравнение филогенетически близких видов сходных размеров, имеющих различную продолжительность жизни. Так, среди небольших млекопитающих у летучих мышей продолжительность жизни больше, а у сумчатых меньше, чем ожидаемая. Птицы и летучие мыши живут в среднем дольше, чем наземные животные сходного размера. Скорее всего, это связано с меньшим эволюционным давлением со стороны хищников. Гибель в раннем возрасте препятствует отбору генетически детерминированных долгожителей, когда же давления со стороны хищников нет, отбор работает в пользу долгоживущих особей.

Можно выделить несколько видов млекопитающих, которые могут служить хорошим примером видов-долгожителей, имеющих короткоживущих собратьев. Наиболее известен грызун *H. glaber* (голый землекоп), продолжительность жизни которого может превышать 30 лет, что в 9 раз больше, чем у родственной ему мыши. Голый землекоп – норное животное, обитающее в Африке. Это единственное по-настоящему общественное высшее животное, наподобие муравьев или пчел. В подземной колонии, из которой грызуны никогда не выходят на поверхность, имеется одна так называемая королева, которая узурпирует возможность размножаться. Остальные особи, рабочие и солдаты, кормят ко-

ролеву и защищают колонию от соседних колоний или змей, основного природного врага голого землекопа. Голый землекоп нечувствителен к холоду и боли, он обитает в душливой атмосфере, содержащей только 8% кислорода и 25% углекислого газа. Известно, что у этого грызуна не образуются злокачественные опухоли, смертность не возрастает с возрастом, т.е. практически отсутствует старение как таковое. Нуклеотидная последовательность генома голого землекопа, определенная группой В. Гладышева [47], содержит 22561 ген, причем в процессе эволюции этот грызун приобрел 750 и потерял 320 генов. В геноме голого землекопа найдены также 244 псевдогена, т.е. гена, испорченных мутациями. Среди утраченных генов выделяются группы генов, ассоциированных с рибосомами и биосинтезом нуклеотидов, обонянием, зрением, сперматогенезом и, возможно, убиквитинированием, т.е. маркированием белков для деградации. Среди белков, специфически представленных в геноме голого землекопа, – два компонента теломер или теломеразы, TERP1 и TERF1. В 39 белках голого землекопа найдено 45 позиций, занимаемых аминокислотами, которые не встречаются в этих положениях у других млекопитающих. В число этих белков входят компоненты аппарата копирования и поддержания целостности ДНК, CCNE1, APEX1, RFC1, TOP2A. Кроме того, уникальные замены найдены в генах системы поддержания температуры тела (UCP1) и зрения (CRYGS). В геноме *H. glaber* обнаружены 1.87 млн полиморфных участков. Столь низкая частота полиморфных участков более характерна для человека, чем для крысы и мыши, родственных голому землекопу. Сравнение 33 генов, экспрессия которых меняется в головном мозге человека при старении, с соответствующими генами голого землекопа показало, что экспрессия 32 из них не изменяется. Среди этих генов – *CYP46A1*, участвующий в обмене холестерина и образовании амилоидных бляшек, и *SMAD3*, кодирующий фактор транскрипции, который замедляет деление клеток и участвует в канцерогенезе. У голого землекопа нарушен механизм синтеза мелатонина, что так же, как и у мыши с искусственно инактивированной мелатониновой системой, коррелирует с пониженной активностью сигнального пути инсулина/IGF1. Результатом адаптации к пониженному содержанию кислорода стали, по-видимому, мутации в факторе, индуцированном гипоксией (HIF1 α), и во взаимодействующем с ним белке VHL. Анализ генома *H. glaber* представляет интересный пример поиска генов, обуславливающих долголетие.

Другим долгоживущим млекопитающим, геном которого был изучен в лаборатории В. Гладышева [48], стала летучая мышь, ночница Брандта. Как уже

упоминалось выше, летучие мыши имеют уникально большую продолжительность жизни по сравнению с млекопитающими сходных размеров. Продолжительность жизни ночницы Брандта превышает 40 лет, что при весе 4–8 г делает ее абсолютным рекордсменом по нарушению правила «чем больше вес, тем больше продолжительность жизни». У этого ночного насекомоядного животного идентифицировано 22 256 генов при общем размере генома 2×10^9 нуклеотидов, а также 194 псевдогена. Обнаружено, что 67 генных семейств значительно увеличились, а 44 сократились. Среди увеличенных семейств можно обратить внимание на гены, связанные с иммунитетом. В ходе эволюции ночница приобрела 349 и потеряла 98 генов. Некоторые гены можно отнести к системам эхолокации, адаптации зрения к сумеречному свету и спячке. Среди изменений генома, отвечающих, возможно, за долголетие, отмечают мутации в генах рецепторов гормона роста (GHR) и инсулиноподобного фактора роста (IGF1R). Мутации в гене *IGF1R* (*daf-2*) найдены у долгоживущих мутантов нематоды *C. elegans*. Изучение экспрессии генов пути инсулина/IGF1, таких, как *FOXO1*, у ночницы Брандта показало, что экспрессия этих генов изменяется, как у долгоживущей мутантной мыши, и характерна для замедленного метаболизма.

МОРСКИЕ ЕЖИ КАК ОБЪЕКТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ДОЛГОЛЕТИЯ

Морские ежи относятся к типу иглокожих, принадлежащих, как и хордовые, к группе вторичноротых (Deuterostomia). При этом между иглокожими и хордовыми больше сходства, чем между любой из этих групп и такими первичноротыми, как членистоногие или моллюски. Взрослые морские ежи имеют выраженную пятилучевую симметрию. Тело морских ежей помещено в кальцитный панцирь округлой формы, состоящий из чередующихся рядов пластин и также имеющий пятилучевую симметрию. Ротовое отверстие расположено внизу тела, а анальное наверху. Снаружи морской еж защищен подвижными иглами, прикрепленными к телу и приводимыми в движение особыми мышцами. Морские ежи привлекали внимание ученых как объект биологии развития. Яйцеклетки и сперматозоиды морские ежи выпускают в воду и их легко получать в лабораторных условиях. Оплодотворение происходит прямо в морской воде, и сразу же начинается деление клетки. Вторая волна интереса к этим животным связана с открытием удивительного долголетия некоторых видов морских ежей. *Strongylocentrotus franciscanus*, или красный морской еж, населяет прибрежную зону тихоокеанского побережья США в районе

холодного калифорнийского течения. Опубликованы доказательства выдающегося долголетия этого вида. Инъекция тетрациклина приводит к включению тетрациклина в известковый панцирь морского ежа. Сбор и анализ морских ежей через год после мечения позволяет оценить годовое увеличение их диаметра в зависимости от исходного размера. Оказалось, что период быстрого роста красного морского ежа переходит в фазу очень медленного роста [49].

Математический анализ распределения морских ежей по размерам позволил определить максимальную продолжительность жизни *S. franciscanus*. Оказалось, что наиболее крупные экземпляры доживают до «преклонного» возраста, превышающего, по меньшей мере, 100 лет. Дополнительное подтверждение получено с помощью анализа распределения изотопа ^{14}C в кальцитном материале зубов *S. franciscanus*. Повышенное содержание данного изотопа в мировом океане, обусловленное проведением открытых ядерных испытаний в пятидесятые годы прошлого столетия, позволило измерить среднюю скорость роста зубов морского ежа за большой период наблюдения, составивший несколько десятков лет [50]. Обе работы [49, 50] показали, что *S. franciscanus* живет более 100 лет. Следует отметить, что не все морские ежи характеризуются таким долголетием. Тихоокеанский морской еж меньшего размера, *S. purpuratus*, имеющий сходные с *S. franciscanus* места обитания, также характеризуется значительной, хотя и меньшей продолжительностью жизни – около 50 лет. В то же время карибский морской еж *Lytechinus variegatus* живет всего 3–4 года [51]. Столь значительные различия в продолжительности жизни близких видов делает их перспективным объектом для поиска генов, связанных с продолжительностью жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практически все популярные теории старения сходятся в том, что оно проявляется как накопление повреждений. Наиболее признанным источником повреждений служат активные формы кислорода, но существуют и другие типы повреждений, связанных со старением, такие, как амилоиды, продукты гликирования, липофусцин и др. Существующие теории расходятся в том, насколько накопление этих вредных продуктов запрограммировано в геноме, и является ли такое «программирование» именно программой самоубийства или просто неизбежной расплатой за дополнительные эволюционные преимущества. Помимо собственно повреждений, важна скорость их накопления, обусловленная общей интенсивностью метаболизма. Наиболее значительные

изменения продолжительности жизни модельных организмов оказались связанными с мутациями, модулирующими именно интенсивность метаболизма. Кроме анализа модельных организмов, продуктивным может оказаться сравнительный анализ геномов

животных-долгожителей и родственных короткоживущих видов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке ЕСН группы и РФФ (грант № 14-24-00061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzzi L., Minucci S., Marcaccio M., et al. // *Cell*. 2005. V. 122. P. 221–233.
- Skulachev V.P. // *IUBMB Life*. 2000. V. 49. P. 177–180.
- Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 4138–4143.
- Harman D. // *J. Gerontol.* 1956. V. 11. P. 298–300.
- Скулачев В.П. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. С. 1700–1714.
- Harman D. // *J. Am. Geriatr. Soc.* 1972. V. 20. P. 145–147.
- de Grey A.D. // *Bioessays*. 1997. V. 19. P. 161–166.
- Barja G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. P. 1167–1172.
- Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., van Remmen H., Buffenstein R. // *Aging Cell*. 2006. V. 5. P. 463–471.
- Labunskyy V.M., Gladyshev V.N. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. P. 1362–1372.
- Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., van Remmen H., et al. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1909–1911.
- Sun J., Tower J. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 216–228.
- van Raamsdonk J.M., Hekimi S. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. e1000361.
- Gladyshev V.N. // *Bioessays*. 2012. V. 34. P. 925–929.
- Gladyshev V.N. // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 506–512.
- Brunk U.T., Terman A. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 1996–2002.
- Schachter F., Faure-Delanef L., Guenot F., Rouger H., Froguel P., Lesueur-Ginot L., Cohen D. // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. P. 29–32.
- Huang Y., Mucke L. // *Cell*. 2012. V. 148. P. 1204–1222.
- Russo C., Violani E., Salis S., Venezia V., Dolcini V., Damonte G., Benatti U., D'Arrigo C., Patrone E., Carlo P., et al. // *J. Neurochem.* 2002. V. 82. P. 1480–1489.
- Sell D.R., Monnier V.M. // *Gerontology*. 2012. V. 58. P. 227–237.
- Monnier V.M., Sell D.R. // *Rejuvenation Res.* 2006. V. 9. P. 264–273.
- Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. // *Vaccine*. 2000. V. 18. P. 1717–1720.
- Dilman V.M. // *Lancet*. 1971. V. 1. P. 1211–1219.
- Dilman V.M., Anisimov V.N. // *Exp. Gerontol.* 1979. V. 14. P. 161–174.
- Оловников А.М. // *ДАН СССР*. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell*. 1985. V. 43. P. 405–413.
- Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. // *Nature*. 1990. V. 345. P. 458–460.
- Hayflick L., Moorhead P.S. // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585–621.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // *Science*. 1994. V. 266. P. 2011–2015.
- McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. // *Nutrition*. 1989. V. 5. P. 155–171. Discussion 172.
- Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. // *Nature*. 1993. V. 366. P. 461–464.
- Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. 481 с.
- Finch C.E., Ruvkun G. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. V. 2. P. 435–462.
- Tissenbaum H.A., Guarente L. // *Nature*. 2001. V. 410. P. 227–230.
- Weismann A. Ueber die Dauer des Lebens, ein Vortrag. Jena: G. Fischer, 1882. 94 p.
- Скулачев В.П. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 827–846.
- Бойко А.Г. // *Журн. общей биологии*. 2007. V. 68. P. 35–51.
- Зюганов В.В. // *Докл. АН*. 2005. V. 403. P. 434–441.
- Попов И.Ю. // *Успехи геронтол.* 2009. Т. 22. С. 596–604.
- Fisher D.O., Double M.C., Blomberg S.P., Jennions M.D., Cockburn A. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 89–92.
- Kirkwood T.B.L. // *Nature*. 1977. V. 270. P. 301–304.
- Brooks-Wilson A.R. // *Hum. Genet.* 2013. V. 132. P. 1323–1338.
- Deelen J., Uh H.W., Monajemi R., van Heemst D., Thijssen P.E., Bohringer S., van den Akker E.B., de Craen A.J., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., et al. // *Age (Dordr.)*. 2013. V. 35. P. 235–249.
- Newman A.B., Murabito J.M. // *Epidemiol. Rev.* 2013. V. 35. P. 181–197.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., et al. // *Science*. 2001. V. 291. P. 1304–1351.
- Austad S.N. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. V. 126. P. 43–49.
- Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., et al. // *Nature*. 2011. V. 479. P. 223–227.
- Seim I., Fang X., Xiong Z., Lobanov A.V., Huang Z., Ma S., Feng Y., Turanov A.A., Zhu Y., Lenz T.L., et al. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2212.
- Ebert T.A. // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. P. 734–738.
- Ebert T.A., Southon J.R. // *Fish. Bull.* 2003. V. 101. P. 915–922.
- Francis N., Gregg T., Owen R., Ebert T., Bodnar A. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 4713–4717.

УДК 616.832.522:616.74-007.23:602.9

Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств

К. Р. Валетдинова^{1,2,3,4}, С. П. Медведев^{1,2,3,4}, С. М. Закиян^{1,2,3,4*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8³Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15⁴Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

Поступила в редакцию 10.10.2014

После доработки 19.01.2015

РЕФЕРАТ За последние 30 лет были открыты и изучены многие молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе болезней моторных нейронов (БМН). Среди этих болезней особое место занимают боковой амиотрофический склероз (БАС), при котором происходит прогрессирующая дегенерация и гибель центральных и периферических двигательных нейронов, и спинальная мышечная атрофия (СМА), одно из наследственных заболеваний, которое лидирует среди наследственных болезней в структуре детской смертности. Эти заболевания, как и большинство нервных, нейродегенеративных и психических болезней, не поддаются лечению на настоящий момент. Большое значение для поиска адекватных терапевтических средств, а также глубокого понимания патогенеза БМН имеют искусственные модельные системы, особенно основанные на использовании эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Данный обзор в основном посвящен последним достижениям в области создания и изучения клеточных и животных моделей БАС и СМА. Рассмотрены также основные проблемы, касающиеся использования клеточных технологий в биомедицинских целях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; моторные нейроны; спинальная мышечная атрофия; эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БМН – болезни моторных нейронов; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЛВД – лобно-височная деменция; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; СМА – спинальная мышечная атрофия; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЦНС – центральная нервная система.

ВВЕДЕНИЕ

В центральной нервной системе (ЦНС) тела моторных нейронов располагаются в двигательных зонах коры головного мозга (верхние или центральные мотонейроны), в ядрах черепно-мозговых нервов ствола головного мозга и в передних рогах серого вещества спинного мозга (нижние или периферические мотонейроны). Отростки этих нервных клеток (аксоны) в составе проводящих путей (пирамидные и экстрапирамидные пути), передних корешков спинного мозга и периферических нервов достигают скелетных мышц, где заканчиваются на иннервируемых

данными клетками мышечных волокнах нервно-мышечным синапсом.

Нейродегенеративные заболевания, при которых поражается преимущественно данная группа нервных клеток, называют болезнями моторных нейронов (БМН). Эти заболевания, как правило, характеризуются мышечной атрофией и параличом, приводящим к смерти пациентов [1]. При спинальной мышечной атрофии (СМА), прогрессирующей мышечной атрофии, спинально-бульбарной мышечной атрофии (болезни Кеннеди) и наследственных моторных невропатиях дегенеративные процессы затрагивают

нижние мотонейроны и их отростки [2]. При первичном латеральном склерозе, наследственной спастической параплегии, прогрессирующем бульбарном и псевдобульбарном параличе, спинальной мышечной атрофии с дыхательной недостаточностью типа I в основном поражаются верхние мотонейроны [2, 3]. А при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) в патологический процесс вовлечены как центральные, так и периферические двигательные нейроны [1].

Наибольший интерес представляют СМА, самое распространенное наследственное нейродегенеративное заболевание, особенно среди детей, и БАС – чрезвычайно гетерогенное заболевание, молекулярные механизмы которого исследованы недостаточно. Поскольку изучать патологические процессы, происходящие в клетках ЦНС при болезнях двигательных нейронов, неинвазивным и безопасным для пациента способом в настоящее время не представляется возможным, а постмортальное изучение тканей больных дает представление только о терминальных стадиях развития заболевания, то актуальной задачей становится получение адекватных модельных систем БАС и СМА. К решению этой проблемы можно подойти двумя путями.

Первый путь – создание животных моделей, в которых экспрессируются человеческие гены, вовлеченные в патогенез этих заболеваний. Однако такие модельные системы по понятным причинам не обладают всеми генотипическими и фенотипическими особенностями, характерными для БМН человека. Поэтому в настоящее время активно развивается второй путь, основанный на получении из плюрипотентных клеток человека моторных нейронов, вызывающих тот или иной фенотип БАС или СМА.

Плюрипотентными называют клетки, в результате дифференцировки которых образуются производные всех трех примитивных зародышевых листков – энто-, мезо- и эктодермы, это клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и эпибласта эмбрионов млекопитающих до [4] и после имплантации [5], а также эмбриональные герминативные клетки. Производные клеток ВКМ и эпибласта доимплантационных эмбрионов, культивируемые *in vitro* и длительно сохраняющие свойства своих предшественников, были названы эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Первые линии ЭСК человека получены еще в 1998 году [6].

В 2006 году группа японских ученых под руководством С. Яманака разработала способ репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние посредством экспрессии четырех факторов – Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4 [7]. Полученные клетки по своим характеристикам были близки

к ЭСК, поэтому были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК).

Моторные нейроны, полученные из ЭСК или ИПСК, представляют собой платформу не только для моделирования заболеваний, но и для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики терапии БМН и повреждений спинного мозга [8, 9]. Они могут использоваться в заместительной клеточной терапии поврежденных нервных клеток, а также в качестве компонентов микроокружения, вырабатывающих нейротрофические факторы и перерабатывающих токсические метаболиты. Терапевтический эффект трансплантации нейральных стволовых клеток, которые оказывают паракринное воздействие на ближайшее клеточное окружение, наблюдали при использовании нескольких моделей нейродегенеративных заболеваний [10, 11]. Для усиления данного эффекта можно искусственно модулировать продукцию конкретных нейротрофических факторов *in vitro*. В этом случае трансплантируемые клетки будут секретировать в поврежденную ткань необходимые для восстановления факторы, как, например, это показано на модели БАС у крыс (Gly93Ala), которым трансплантировали нейральные прогениторные клетки человека, экспрессирующие ГНТФ (глиальный нейротрофический фактор) [12].

В данном обзоре рассмотрены основные известные модельные системы БАС и СМА. Особое внимание уделено системам *in vitro*, а также вопросам применения клеточных технологий на практике.

БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ

Общая характеристика

Боковой амиотрофический склероз (БАС) (известный также как болезнь Лу Герига) впервые подробно описан в 1869 году выдающимся французским врачом, специалистом в области неврологических заболеваний Жаном-Мартеном Шарко. В самом названии отражены отличительные особенности этого заболевания: мышечная атрофия («амиотрофический»), обусловленная избирательным поражением периферических двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и двигательных ядер ствола мозга, а также корковых мотонейронов и боковых столбов спинного мозга («боковой склероз») [13]. Смерть пациентов, как правило, наступает в результате полного отказа дыхательной мускулатуры через 2–5 лет с момента появления первых симптомов [14].

БАС – орфанное заболевание, частота которого в разных популяциях составляет от одного–двух до четырех–шести случаев на 100000 человек в год [15–17]. В настоящее время в США зарегистрировано около 25000 больных БАС, средний возраст которых

составляет 55 лет. Кроме того, у мужчин БАС наблюдается чаще, чем у женщин (в соотношении 3 : 2) [18].

Выделяют sporadicкую и семейную (или наследственную) форму БАС, причем на долю sporadicческой формы приходится порядка 90% всех случаев этого заболевания. Факторами риска БАС считаются воздействие тяжелых металлов, токсинов, например, естественного токсина цианобактерий β -N-метиламино-L-аланина, курение, тяжелые черепно-мозговые травмы, повышенная двигательная активность, латентные инфекции вирусной и невирусной природы, аутоиммунные реакции [19–26].

По современным представлениям наследственная форма БАС сцеплена с мутациями в 12 генах [1]. Всего же с развитием БАС ассоциированы мутации в 116 генах, представленные в постоянно обновляющейся базе данных ALSod (Amyotrophic lateral sclerosis Online Database – онлайн база данных БАС) [27]. В основном это однонуклеотидные замены в кодирующей части генов, делеции, инсерции, и экспансия повторенных последовательностей. К наиболее распространенным генетическим причинам БАС относятся экспансия гексануклеотидных повторов GGGGCC в первом интроне/промоторе гена *C9ORF72* [28–30], а также мутации в генах *SOD1* (*superoxide dismutase 1*, кодирует Cu/Zn-связывающую супероксиддисмутазу 1) [31], *TDP-43* (*TAR DNA-binding protein 43*, фактор транскрипции TAR, ДНК-связывающий белок) [32], *FUS* (*fused in sarcoma*, РНК-связывающий белок FUS) [33, 34], *ANG* (*angiogenin*, ангиогенин, рибонуклеаза) [35], *OPTN* (*optineurin*, оптинейрин) [36], *VCP* (*valosin containing protein*, валозинсодержащий белок) [37].

SOD1 экспрессируется во всех типах клеток, локализуется в цитоплазме, катализирует превращение супероксидного анион-радикала в свободный кислород и пероксид водорода. Мутации в гене *SOD1* наиболее многочисленны (свыше 160) [1], однако далеко не все из них приводят к формированию нефункционального белкового продукта, что объясняло бы решающую роль окислительного стресса и дисфункции митохондрий в патогенезе БАС. *TDP-43* и *FUS* – это мультифункциональные белки, участвующие в экспрессии генов и ее регуляции, включая транскрипцию, процессинг РНК, транспорт и трансляцию, а также синтез микроРНК. Цитоплазматические агрегаты *TDP-43* и *FUS* находят у больных ЛВД (лобно-височной деменцией) [38, 39]. Белковый продукт гена *ANG* также принимает участие в регуляции транскрипции. БАС-ассоциированные мутации *OPTN* активируют фактор транскрипции NF- κ B, а также влияют на распределение оптинейрина в цитоплазме. *VCP* участвует во множестве клеточных процессов, включая регуляцию клеточного цикла,

формирование ядерной оболочки, биогенез аппарата Гольджи, а также является одним из компонентов убиквитин-зависимой системы протеолиза [40].

При БАС страдают не только моторные, но и другие типы нейронов, а некоторые формы БАС сочетаются с ЛВД или с дегенерацией дофаминергических нейронов, расположенных в структурах среднего мозга, в составе базальных ганглиев (полосатое тело), лимбической системе (гиппокамп) и гипоталамусе. Даже у больных, в клинической картине которых доминируют дисфункции двигательной системы, обнаружены гистологические изменения в нескольких типах нейронов, включая клетки гиппокампа и базальных ганглиев [41].

Однако, несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не найдено методов эффективной терапии БАС, и лечение сводится фактически к купированию симптомов. Так, препарат рилузол, ингибитор высвобождения глутамата, обладая нейропротекторными свойствами, способен модулировать течение БАС, увеличивая продолжительность жизни больных на 2–3 месяца, но при этом ни в коей мере не ослабляя симптомов [42]. В США одобрено использование системы, стимулирующей диафрагму NeuRx DPS (Diaphragm Pacing System). Эта система позволяет на несколько месяцев продлить период времени, в течение которого больные БАС могут дышать самостоятельно без использования искусственной вентиляции легких.

Получение адекватных модельных систем БАС должно помочь в поиске эффективных лекарственных средств и ответа на вопрос, каким образом столь разнообразные молекулярные изменения приводят к избирательной гибели моторных нейронов.

Основные лабораторные модели БАС

Создание животных модельных систем БАС позволило расширить наше представление об этом заболевании и выявить ряд механизмов, приводящих к развитию БАС, включая дисфункцию митохондрий, мисфолдинг (неправильная упаковка) белков и образование белковых агрегатов, окислительный стресс, глутаматную эксайтотоксичность, нечеточные автономные эффекты, воспалительные процессы в нервной ткани, нарушение аксонального транспорта, нарушение процессинга РНК и др. (рис. 1).

Первые мыши, несущие мутации в гене *SOD1*, были получены еще в начале 90-х годов двадцатого века [31]. Мыши и крысы с разнообразными мутациями в этом гене являются наиболее детально изученной животной моделью БАС (табл. 1). Эти животные имеют летальный фенотип с поздней манифестацией, который характеризуется мышечной денервацией, активацией астроцитов и микроглии, потерей мотор-

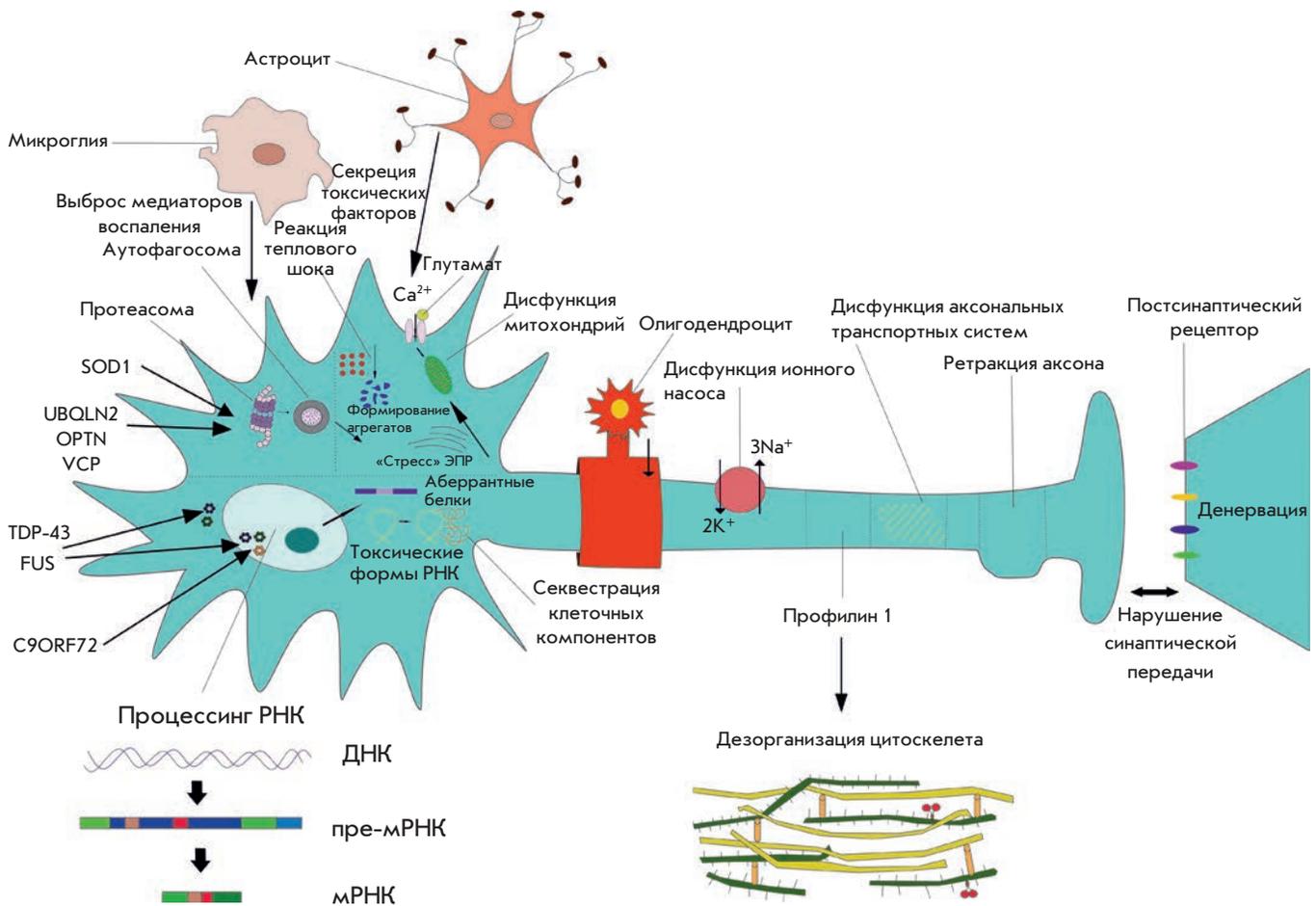


Рис. 1. Общая схема этиопатогенеза БАС. Мутации в генах *SOD1*, *VCP*, *UBQLN2*, *OPTN*, *CHMP2B* и, возможно, *TARDBP* вызывают изменения в системах деградации белков, нарушая нормальную протеасомную и аутофагосомную утилизацию. Мутации в генах *C9ORF72*, *TARDBP*, *FUS* нарушают процессинг РНК, в результате формируется большое количество aberrантных (неправильно собранных) белков и токсических форм РНК. Эти изменения приводят к внутриклеточной протеинопатии, характеризующейся образованием скоплений и гранул, стрессом эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, нарушением функционирования митохондрий. Дезорганизация цитоскелета аксонов и дисфункция систем аксонального транспорта приводят к денервации мотонейронов, расположенных ниже в цепи передачи сигнала (периферические мотонейроны), или мышечных волокон. Клетки, не относящиеся к нейронам, в том числе астроциты, микроглия, олигодендроциты, модифицируют этот процесс, так как не могут обеспечить нормальную жизнедеятельность нервных клеток и, кроме того, оказывают токсическое воздействие. Факторы, детерминирующие уровень чувствительности к повреждениям, в том числе факторы, модулирующие характер стрессового ответа (активация белков теплового шока) и обеспечивающие «предрасположенность» к эксайтотоксичности (особенности глутаматных рецепторов), определяют, какие именно нейроны в наибольшей степени будут подвержены данным процессам. Влияние таких белков, как профилин 1 и NFH (neurofilament heavy chain – белок тяжелой цепи нейрофиламентов), в данной модели проявляется на значительном удалении от тела нервной клетки. Они воздействуют напрямую на цитоскелет и оксидазу *D*-аминокислот, которая играет важную роль при эксайтотоксичности. Системы, участвующие в сигнальных процессах аксонального «наведения» (например, белки семейства семафоринов), а также в определении топографии связей в нервной системе (например, белки из семейства эфринов и ретикулонов), по-видимому, запускают процессы ретракции аксонов и денервации

ных нейронов в спинном мозге. Индуцировать такой фенотип можно, если обеспечить сверхэкспрессию мутантного белка *SOD1*, поэтому контролем в подобных экспериментах должны служить животные с повышенной экспрессией нормального белка.

Эффекты недостаточности *TDP-43* изучают на различных модельных организмах (табл. 1). У *Drosophila melanogaster* нокаут *TDP-43* приводит к появлению разнообразных нервно-мышечных дефектов [43], а у полосатого данио (*Danio rerio*) нока-

Таблица 1. Модели бокового амиотрофического склероза у животных

Модельный объект	Ген	Фенотип	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS</i>	Нарушение целостности митохондриальных мембран, образование агрегатов TDP-43 и FUS.	[155–158]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS, tdp-1</i>	Некоординированные движения и локомоторные дефекты, паралич, дегенерация моторных нейронов, нарушение синаптической передачи, аккумуляция в ядре агрегатов TDP-43, образование агрегатов SOD1.	[159–164]
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS</i>	Двигательные дефекты, стрессовая активация глиальных клеток, образование агрегатов SOD1, глиоз, аксональная дегенерация, атрофия нейронов. В целом эффекты варьируют в зависимости от того, в какой ткани экспрессируются нормальные/мутантные белки SOD1, TARDBP, FUS.	[165–173]
<i>Danio rerio</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS, Sod1</i>	Двигательные дефекты, мышечная атрофия, утрата моторных нейронов, сниженная выживаемость.	[174–176]
<i>Mus musculus</i> <i>Rattus norvegicus</i>	<i>TARDBP, SOD1, Sod1, Tardbp</i>	Фенотип БАС: тремор, прогрессирующие моторные нарушения и паралич, глиоз, убиквитинированные включения SOD1, дегенерация аксонов и моторных нейронов, вакуолизация митохондрий, редкие цитоплазматические агрегаты фосфорилированного TDP-43.	[48, 51, 177–192]
Собаки пород Pembroke Welsh corgi, Boxer, Rhodesian ridgeback, German Shepherd, Chesapeake Bay	<i>SOD1</i>	Дегенеративная миелопатия собак: в цитоплазме нейронов наблюдаются включения, связывающиеся с антителами к SOD1; демиелинизация белого вещества латеральных пучков и потеря аксонов.	[193, 194]
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>TDP-43</i>	Накопление в цитоплазме агрегатов TDP-43 и цистатин С-позитивных гранул; прогрессирующая моторная слабость дистальных отделов верхних конечностей, фасцикуляция и атрофия.	[52]

даун TDP-43 вызывает образование укороченных аксонов с неправильным ветвлением [44]. У мышей гомозиготная делеция гена *Tardbp*, который кодирует TDP-43, летальна, однако у гетерозиготных животных наблюдаются лишь умеренные моторные дефекты [45]. У дрожжей, нематоды и *D. rerio* сверхэкспрессия мутантного TDP-43 индуцирует более серьезные нарушения, чем сверхэкспрессия нормального белка [44–46]. Повышенная экспрессия нормального или мутантного белка TDP-43 у грызунов приводила к формированию фенотипа с кортикальными нарушениями с вовлечением в ряде случаев периферических моторных нейронов [47–51]. У яванского макака (*Macaca fascicularis*) сверхэкспрессия TDP-43 в спинном мозге индуцировала прогрессирующую гибель моторных нейронов [52].

Показано, что некоторые делеции в гене *Fus* у мышей летальны или индуцируют фенотип, не связанный с нейродегенерацией [53, 54]. У мышей с нокаутом *FUS* в нейронах гиппокампа снижено количество дендритов и выражены дефекты морфологии этих отростков [55]. Сверхэкспрессия нормального белка *FUS* человека у трансгенных мышей вызывала активную дегенерацию моторных нейронов, которая характеризуется образованием глобулярных и «подобных клубку пряжи» *FUS*-позитивных включений в двигательных нейронах [56]. У крыс сверхэкспрес-

сия *FUS* с мутацией Arg521Cys приводила к гибели кортикальных, гиппокампальных и моторных нейронов, а также к денервации и развитию параличей [57].

Таким образом, данные модели БАС показывают важную роль белков SOD1, TDP-43 и FUS в функционировании различных клеток нервной системы, в том числе моторных нейронов.

Клеточные модели БАС

К настоящему времени получены клеточные модели как наследственной, так и спорадической формы БАС (табл. 2). Однако технологии и подходы, в которых используются ИПСК пациентов, применяются в основном не для прямого поиска способов терапии, а для выявления и глубокого анализа механизмов патогенеза этого нейродегенеративного заболевания.

Клеточные модели наследственной формы БАС

SOD1. В моторных нейронах, содержащих ген *SOD1* с мутацией Asp90Ala, наблюдаются признаки агрегации нейрофиламентов, которая приводит к дегенерации нейритов [58]. Обнаружено, что мутантный белок *SOD1* способен связываться с 3'-нетранслируемой областью мРНК одного из компонентов нейрофиламентов – *NF-L*, понижая ее стабильность. Тем самым нарушается соотношение отдельных субъеди-

Таблица 2. Клеточные модели бокового атрофического склероза

Ген	Мутация	Фенотип	Ссылка
<i>TDP-43</i>	Met337Val Gln343Arg Gly298Ser	Снижение выживаемости, повышенная чувствительность к ингибированию киназы PI3K, повышенный уровень белка TDP-43.	[65, 68–70]
<i>SOD1</i>	Gly85Ser Leu144Phe Ala4Val Asp90Ala Asn87Ser Ser106Leu	Сверхвозбуждение мембран, агрегация нейрофиламентов, дисфункция митохондрий, окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума.	[58, 60, 146, 195, 196]
<i>FUS</i>	His517Gln	Сверхвозбуждение мембран, агрегаты FUS.	[60]
<i>C9ORF72</i>	Экспансия гексануклеотидного повтора GGGGCC в первом интроне/промоторе	Аномальные электрофизиологические показатели, сверхвозбуждение мембран, образование фокальных гранул РНК <i>C9ORF72</i> , содержащих белки hnRNP A1 и Pur-α.	[60, 71]
Спорадическая форма		Внутриядерные агрегаты гиперфосфорилированного белка TDP-43.	[75]

ниц нейрофиламентов в моторных нейронах. Именно это взаимодействие может запускать цепь событий, которая приводит к избирательной гибели моторных нейронов [58].

В моторных нейронах с миссенс-мутацией Ala4Val в гене *SOD1* обнаруживаются дефекты в системе митохондриального транспорта и изменения морфологии митохондрий. В них наблюдаются проявления окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума, а также активируются реакции несвернутых белков (ПНБ) [59]. Кроме того, анализ результатов высокопроизводительного секвенирования мРНК с помощью платформ DAVID и GSEA показал, что в мотонейронах с генотипом *SOD1*^{+/44V} транскрипция генов изменена по сравнению с изогенным контролем без этой мутации. В мотонейронах с мутацией *SOD1* повышен уровень транскрипции генов, кодирующих сократительные белки, в частности кинезины, а также генов, участвующих в формировании цитоскелета и регуляции транскрипции. При этом уровень транскрипции генов, вовлеченных в функционирование митохондрий и трансляцию, в этих клетках был существенно снижен [59].

Электрофизиологическое исследование моторных нейронов, полученных из ИПСК пациентов с мутациями в гене *SOD1*, а также в *C9ORF72* и *FUS*, выявило сверхвозбуждение их мембран, которое может быть основным элементом патогенеза БАС, приводящим к гибели мотонейронов [60]. В таких клетках отмечалось снижение амплитуды медленного-выпрямляющего калиевого тока, что может быть причиной сверхвозбуждения их мембран. Применение активатора калиевых каналов ретигабина блокировало сверхвозбуждение и повышало выживаемость моторных нейронов, несущих мутации в гене *SOD1* [60].

Проведенный на ЭСК мышей с мутациями *SOD1* скрининг выявил ряд возможных лекарственных средств [61]. Ранее была обнаружена связь между киназой-3-гликогенсинтазы (*GSK-3*, glycogen synthase kinase 3) и БАС [62]. Установлено, что ингибирование *GSK-3*-пути снижает апоптоз нейронов [63, 64]. Один из ингибиторов этого пути, кенпаулон, вызывал существенное увеличение жизнеспособности моторных нейронов мышцы с мутациями *SOD1*, а также повышал выживаемость мотонейронов, полученных после дифференцировки ИПСК больных БАС [61].

Кроме того, первичная культура клеток глии мышцы, экспрессирующая мутантный (Gly93Ala) белок *SOD1* человека, оказывает повышенное токсическое действие на моторные нейроны. Вероятнее всего, в случае мутаций в *SOD1* патогенез БАС происходит по неавтономному механизму [65, 66].

TDP-43. Известно, что в 97% случаев БАС и в 45% случаев ЛВД в моторных нейронах обнаруживаются агрегаты белка TDP-43 [67]. Установлено, что в моторных нейронах, полученных из ИПСК с миссенс-мутацией Met337Val в гене *TDP-43*, повышен уровень растворимого и устойчивого к детергентам белка TDP-43, снижена выживаемость при длительном культивировании, а также повышена чувствительность к ингибированию киназы PI3K [68].

Изучение астроцитов, полученных из мутантных ИПСК (Met337Val), показало, что в них, как и в моторных нейронах, повышен уровень белка TDP-43, агрегаты которого обнаруживаются преимущественно в цитоплазме клеток. Эти клетки обладают также сниженной выживаемостью в культуре [65]. Сокультивирование мутантных астроцитов с мутант-

ными и контрольными моторными нейронами показало, что присутствие астроцитов не влияет на жизнеспособность моторных нейронов. Это доказывает, что в случае мутаций в гене *TDP-43* патогенез БАС происходит по клеточно-автономному пути [65].

В моторных нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов, несущих мутации *TDP-43* Met337Val, Gln343Arg и Gly298Ser, повышено количество нерастворимой формы белка TDP-43, связанного с белком сплайсосом SNRPB2 [69]. Кроме того, в этих клетках повышен уровень транскрипции генов, вовлеченных в метаболизм РНК, и снижен уровень транскрипции генов, кодирующих белки цитоскелета. Были протестированы пять соединений – ингибиторов ферментов, участвующих в установлении ковалентных модификаций хроматина и белков, связанных со сплайсингом РНК: трихостатин А (ингибитор гистон-деацетилазы), сплайсостатин А (ингибитор белков сплайсосом), анакардиевая кислота и гарцинол (ингибиторы гистон-ацетилазы). Оказалось, что анакардиевая кислота способна повышать выживаемость мутантных моторных нейронов, снижать уровень транскрипции мРНК гена *TDP-43* и уровень белка TDP-43 в нерастворимой фракции, а также увеличивать длину нейритов моторных нейронов [69].

ИПСК могут использоваться не только для поиска новых соединений, потенциальных лекарственных средств от БАС, но и для изучения альтернативных способов терапии, например, с помощью РНК-интерференции. В результате дизайна малых интерферирующих РНК (миРНК), предназначенных для аллель-специфического подавления трансляции мутантного белка (Met337Val) TDP-43 [70], было показано, что применение миРНК позволяет снизить на 30% уровень цитоплазматического белка TDP-43 в нейтральных стволовых клетках, полученных из ИПСК больного [70].

C9ORF72. РНК мутантного гена *C9ORF72* с аномальным числом гексануклеотидов GGGGCC в первом интроне/промоторе также может инициировать патологический процесс при БАС. В моторных нейронах, полученных после дифференцировки ИПСК от пациента с семейной формой С9-БАС (экспансия гексануклеотидных повторов в гене *C9ORF72*), отмечен повышенный уровень транскрипции *C9ORF72*, а также образование фокальных скоплений РНК *C9ORF72*, содержащих, помимо прочего, РНК-связывающие белки hnRNP A1 и Pur- α [71]. Известно, что hnRNP A1 связывается с молекулами TDP-43 [72], поэтому при удалении hnRNP A1 из фокальных скоплений изменяется, вероятно, взаимодействие TDP-43 со своими РНК-мишенями. Таким образом, между дву-

мя формами БАС (С9-БАС и опосредованный TDP-43 БАС) обнаруживается потенциальная взаимосвязь. Кроме того, обнаружено, что мутации в белках hnRNP A1 и hnRNP A2/B1 являются одной из причин БМН у человека [73]. Также показано, что Pur- α взаимодействует с фокальными скоплениями РНК, содержащими повторы GGGGCC, и модулирует токсическое действие подобных образований в модели БАС у *D. melanogaster* [74]. Клетки, экспрессирующие мутантную РНК гена *C9ORF72*, имеют измененный уровень экспрессии генов, связанных с возбудимостью мембран, в частности *DPP6*, и имеют аномальные электрофизиологические показатели. Применение антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных к РНК гена *C9ORF72*, позволяет подавлять формирование фокальных скоплений и восстанавливать нормальный уровень транскрипции генов в моторных нейронах [71]. Эти работы служат примером того, что дифференцированные производные ИПСК можно применять для поиска и изучения потенциальных лекарственных средств [61, 69].

Клеточные модели sporadic формы БАС

От пациентов со sporadic формой БАС Бурхард и соавт. [75] получили линии ИПСК, имеющие уникальный генетический и эпигенетический фон. В ядрах мотонейронов, дифференцированных из этих клеток, уже через 2 месяца культивирования наблюдалось образование гиперфосфорилированных агрегатов белка TDP-43 [75], однако скопления меченных убиквитином гранул TDP-43 обнаружены не были. Это позволило сделать вывод о том, что убиквитинированию TDP-43 подвергается на более поздних стадиях данной протеинопатии, чем гиперфосфорилированию. Авторы отмечают, что для изучения причин, приводящих к столь большому разнообразию sporadic случаев БАС, важно проводить дифференцировку ИПСК, полученных от разных пациентов, не только в моторные нейроны, но и в клетки других типов. Эта модель представляет особый интерес для поиска терапевтических агентов и факторов, модифицирующих БАС.

СПИНАЛЬНАЯ МЫШЕЧНАЯ АТРОФИЯ

Общая характеристика

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – нейродегенеративное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующееся дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, приводящей к мышечной атрофии, параличу и смерти пациента [76–78]. Впервые спинальная мышечная атрофия у детей была описана

Г. Вердником в 1891 году. Частота встречаемости этого заболевания в европейских популяциях равна 1 на 10000 новорожденных, при этом частота носительства мутантного гена равна 1 на 40–50 [79].

Более 95% больных СМА имеют гомозиготную делецию в гене *SMN1* (*Survival Motor Neuron1*), расположенном на хромосоме 5, в единичных случаях встречаются инверсии, мутации по типу сдвига рамки считывания, миссенс-, нонсенс-мутации и изменения сайтов сплайсинга [80, 81]. Полный список известных мутаций гена *SMN1* доступен в базе данных Leiden Open Variation Database (http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select_db=SMN). На этой же хромосоме расположен псевдоген *SMN2*, который отличается от *SMN1* всего лишь восемью однонуклеотидными заменами: по одной в седьмом и восьмом экзонах, остальные замены находятся в интронах [82]. Замена С на Т в седьмом экзоне приводит к изменению сплайсинга транскрипта *SMN2*, в результате чего 90% транслируемых РНК не содержат экзон 7, а белковый продукт получается укороченным и нестабильным [83, 84] (рис. 2). При этом число копий псевдогена в геноме разных индивидов может варьировать от 0 до 6. Чем больше копий *SMN2*, тем меньше тяжесть симптомов СМА [85–87]. Значимость гена *SMN2* для развития более легкой формы спинальной мышечной атрофии подтверждается бессимптомными случаями, когда у индивидов, гомозиготных по делеции гена *SMN1*, достаточно велико (четыре и более) число копий гена *SMN2* [88].

В зависимости от возраста манифестации, тяжести течения и продолжительности жизни различают следующие типы этого заболевания [89]:

Тип I (болезнь Вердника–Гоффмана) – наиболее тяжелая форма, которая проявляется в течение первых 6 месяцев жизни и характеризуется выраженными признаками паралича мышц конечностей и туловища, а также дыхательной мускулатуры, дети не могут самостоятельно сидеть и держать голову. Продолжительность жизни при этой форме заболевания не превышает 2 лет.

Тип II – промежуточная форма, имеет более позднее начало, как правило, в возрасте 7–18 месяцев. Больные дети могут сидеть, но никогда не начинают ходить самостоятельно. Продолжительность жизни – более 2 лет.

Тип III (болезнь Кугельберга–Веландер) – легкая/умеренная форма. Первые симптомы появляются после 18 месяцев. Больные могут стоять и ходить.

Тип IV – взрослая форма. В большинстве случаев начинается после 20–30 лет, не влияет значительно на продолжительность жизни. Проявляется слабостью проксимальной мускулатуры, фасцикуляциями – непроизвольными, беспорядочными сокраще-

ниями отдельных групп мышечных волокон, а также снижением сухожильных рефлексов.

Белковый продукт гена *SMN1* выполняет в клетке несколько функций: участвует в сплайсинге пре-мРНК, транспортировке зрелых мРНК и росте аксонов [90–94]. *SMN* – центральный компонент сложного комплекса, необходимого для сборки сплайсосомных частиц мРНК (small nuclear ribonucleic particles, snRNP, – малые ядерные рибонуклеопротеиды) [95]. Известно, что в каждом цикле сплайсинга ассоциация между собой компонентов сплайсосом происходит каждый раз заново путем пошаговой сборки, из чего следует, что мутантный *SMN* не способен обеспечить эффективную сборку частиц мРНК. Поэтому одна из гипотез, объясняющих механизм СМА, основана на предположении о том, что нарушение формирования мРНК влияет на сплайсинг определенной группы генов, важных для функционирования цепи моторных нейронов [95–97].

В 2006 году была обнаружена аксональная изоформа белка (α -*SMN*), продукта гена *SMN1* [98]. Аксональный *SMN*-транскрипт отличается от полноразмерного транскрипта включением последовательности интрона 3, однако белок, транслируемый с данного транскрипта, короче белка *SMN* из-за стоп-кодона, находящегося на границе экзона 3 и интрона 3. Таким образом, белки *SMN* и α -*SMN* имеют идентичные N-концевые участки и отличаются C-концевой частью. α -*SMN*-белок, как обнаружено, селективно экспрессируется в течение критической фазы развития мотонейронов и локализуется преимущественно в аксонах, стимулируя аксоногенез. Во взрослом состоянии экспрессия данного белка снижается [98]. Однако существование специфической нейрональной изоформы α -*SMN* не объясняет того важного факта, что в большинстве случаев СМА в мРНК гена *SMN2* отсутствует экзон 7, поскольку кодирующими в α -*SMN* являются только первые четыре экзона [99]. Поэтому вторая гипотеза предполагает, что при СМА нарушается та важнейшая функция, которую выполняет *SMN* в аксонах моторных нейронов [91, 94–97, 99, 100]. Так почему же при мутациях *SMN1* избирательно гибнут именно двигательные нейроны? И как можно помочь больным СМА? Ответить на эти вопросы должны помочь искусственные модельные системы.

Основные животные модели СМА

Недостаток белка *SMN* изучается на нескольких модельных организмах (табл. 3). Однако работа с животными осложняется тем, что их геномы содержат только один ген *Smn*, эквивалентный гену *SMN1* человека, но у них нет псевдогена *SMN2*. Поэтому при нокауте *Smn* все животные погибают, а время

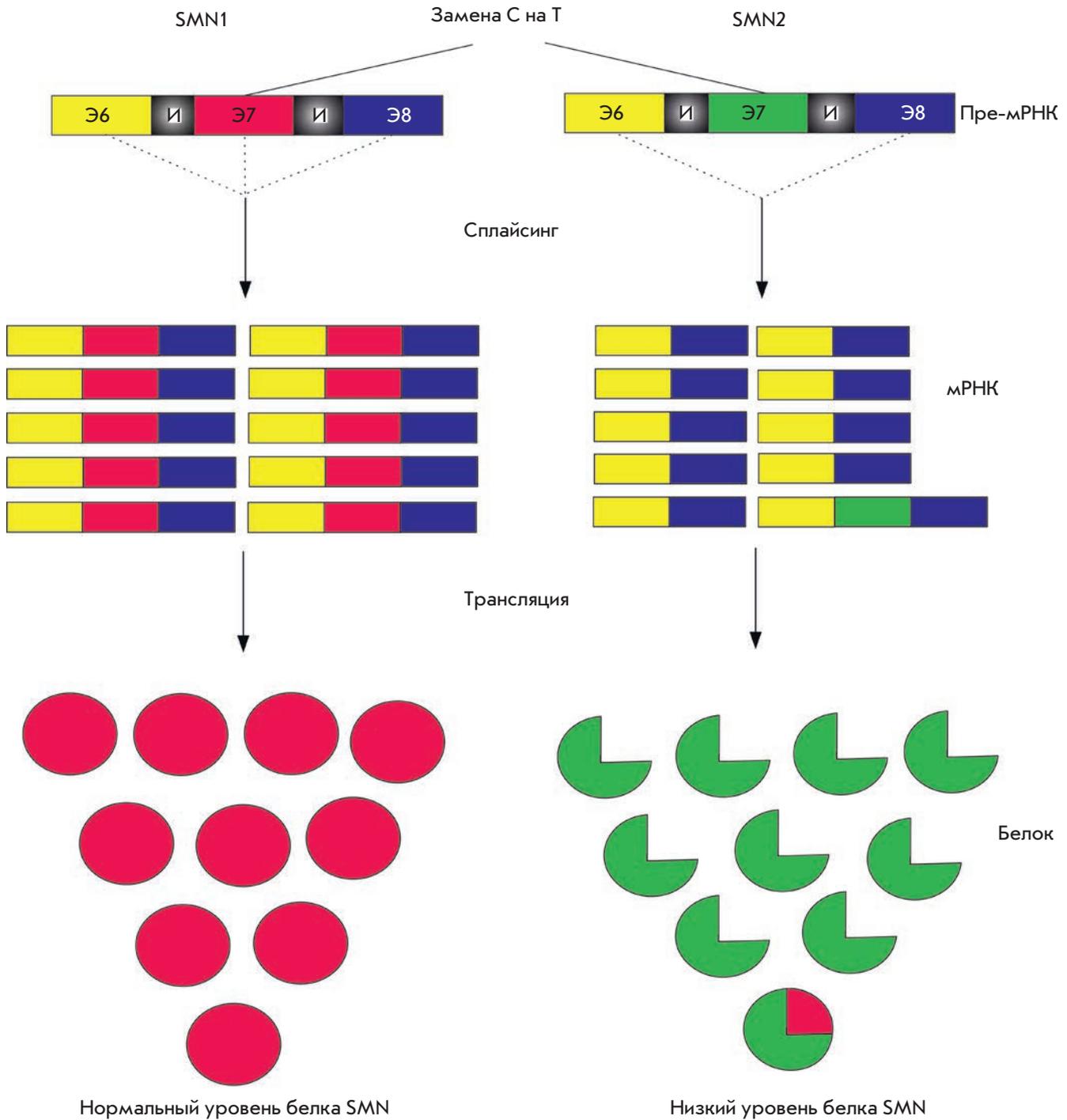


Рис. 2. Экспрессия генов *SMN1* и *SMN2* (описание в тексте)

гибели определяется уровнем мРНК этого гена, которая досталась новому организму от матери. Так, у мышей гибель происходит на ранних этапах развития [101], а у организмов, откладывающих яйца, например у *D. melanogaster*, смерть наступает позднее, когда уровень белка SMN, доставшегося от матери, снизится до критической точки [102]. Как и ожида-

лось, нокаут *Smn* в определенной ткани приводил к нарушению развития этой ткани и гибели большей части ее клеточного компонента [103–105]. Трансгенным мышам со СМА обычно внедряют в геном дополнительные копии *SMN2*. Две копии этого гена обеспечивают большую выживаемость эмбрионов, в то время как восемь копий приводят к появ-

Таблица 3. Модели спинальной мышечной атрофии у животных

Объект	Манипуляции с геном <i>SMN (Smn)</i>	Фенотип	Ссылка
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Нокаут	Гибель	[197–199]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Нокаут, нокадаун, точковые мутации	Гибель эмбрионов, дефекты развития, моторные дефекты, уменьшение продолжительности жизни.	[109, 200, 201]
<i>Drosophila melanogaster</i>	Точковые мутации, эквивалентные нулевым аллелям, мутации, приводящие к нарушению распределения <i>Smn</i> у взрослых мух, нокадаун	Гибель эмбрионов, потеря способности летать и прыгать.	[102, 112, 202]
<i>Danio rerio</i>	Нокадаун	Гибель, нарушение формирования аксонов.	[91]
<i>Mus musculus</i>	Нокаут, направленное изменение экспрессии в определенных тканях в конкретные промежутки времени, внедрение трансгенов гена <i>SMN1</i> человека с известными миссенс-мутациями, внедрение дополнительных копий <i>SMN2</i>	Гибель эмбрионов, апоптоз клеточного компонента ткани, в которой не экспрессируется <i>Smn</i> , фенотип варьирует в зависимости от типа мутации и наличия дополнительных трансгенов, две копии увеличивают продолжительность жизни эмбрионов до 5 дней.	[101, 103–107, 203]

лению мышечной с нормальным фенотипом [106, 107]. Показано, что двух копий *SMN2* достаточно для нормального функционирования большинства тканей, однако моторным нейронам необходим более высокий уровень *SMN*, по крайней мере, у мыши [108].

Для проведения трудоемких экспериментов используют, как правило, беспозвоночных и позвоночных, не относящихся к классу млекопитающих. Например, на *C. elegans* и *D. melanogaster* удобнее проводить полномасштабный молекулярно-генетический скрининг химических агентов – потенциальных кандидатов на роль лекарственных средств. Так, на нематоде с мутацией *smn-1(cb131)* были отобраны три вещества, наиболее эффективно изменяющие мутантный фенотип: 4-AP (блокатор калиевых каналов), габоксадолгидрохлорид (рецепторный агонист GABA_A) и моносахарид Neu5Ac [109]. Таким образом, эта модель может служить основой для скрининга соединений, модифицирующих функции белка *Smn*.

Действие самых эффективных веществ далее изучают на более сложных объектах, в частности на *D. rerio* и мыши. Появились данные о том, что GTP-аза RhoA и активирующая ее Rho-киназа (ROCK), участвующие в обеспечении формирования цитоскелета, имеют важное значение при заболеваниях моторных нейронов. Добавление ингибиторов ROCK мышам со СМА увеличивало продолжительность их жизни, улучшало состояние нервно-мышечных синапсов и скелетных мышечных волокон [110]. Эти данные находят подтверждение и у человека. Так, в ходе проведения полногеномного анализа метилирования были обнаружены значительные отличия в уровне метилирования ДНК двух генов *CHML* и *ARHGAP22* у больных СМА и здоровых индивидов. Продукты

этих генов регулируют функцию GTP-аз Rho и Rab – регуляторов динамики актина и, следовательно, могут влиять на инициацию, рост, направление и ветвление аксонов [111].

Результаты, полученные на различных животных моделях СМА, следует интерпретировать с осторожностью. Например, у *D. melanogaster* можно добиться выживания *SMN*-дефицитных мух путем экспрессии этого белка в мышечной ткани [102, 112]. А у мышей со СМА экспрессия *SMN* в мышцах такого эффекта не дает [108]. Однако можно обратить внимание, что в этих экспериментах у *D. melanogaster* *SMN* экспрессировался в мезодермальных предшественниках мышечных волокон, а у мышей – в уже сформированных мышечных волокнах, которые более не делятся.

Клеточные модели СМА

В настоящее время получены ИПСК больных СМА типа I [113–115]. Эти клетки дифференцируются в моторные нейроны *in vitro* с той же изначальной эффективностью, как и контрольные клетки, не имеющие в геноме мутаций *SMN1* [113, 114]. Однако во время продолжительного культивирования число и размер моторных нейронов, полученных от больных СМА, существенно сокращается по сравнению с культурами моторных нейронов здоровых доноров [113]. Подобное сокращение обусловлено повышенным уровнем апоптоза, опосредованного Fas-лигандом, и активацией каспаз-8 и -3. При этом добавление антител, специфичных к Fas-лиганду, и применение ингибитора каспазы-3 снижают уровень апоптоза мотонейронов [114].

В нейронах и астроцитах белок *SMN* локализуется в цитоплазме, а в ядре нервных клеток он располага-

ется в составе особых структур – «gems» («gemini of coiled bodies» – «близнецы телец Кахаля»), названных так из-за сходства строения и функций, а также близкого расположения. Тельца Кахаля участвуют в созревании, сборке и транспорте мРНК, как и ассоциированные с ними gems [116]. Показано, что количество gems в ядре коррелирует с формой СМА [117]. У здоровых людей число gems соответствует числу телец Кахаля и они легко детектировались. У больных СМА типа I обнаружены только тельца Кахаля, тогда как gems отсутствовали, а при СМА типа III gems выявлены только в некоторых ядрах [118, 119]. В ядрах нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК больных СМА, gems отсутствуют. Добавление вальпроевой кислоты и тобрамицина, применяемых в терапии СМА, существенно повышало число gems в клеточных ядрах и уровень белка SMN, однако и общий уровень белка SMN, и число gems все равно оставались значительно ниже, чем в клетках здоровых доноров [113].

В работе Корти с соавт. ИПСК от больных СМА получали, используя невирусные, неинтегрируемые в геном эписомные вектора [115]. Затем трансфицировали полученные клетки короткими одноцепочечными олигонуклеотидами, комплементарными 75 нуклеотидам кодирующей цепи этого гена. В центральной части этих олигонуклеотидов содержалась замена (такая же, как в экзоне 7, которая препятствует образованию полноценного белка). При рекомбинации с такой донорной молекулой в некоторых клетках ген *SMN2* становился «*SMN1*-подобным геном», т.е. с него транслировался нормальный полноразмерный белок SMN. Моторные нейроны, полученные из таких клеток с исправленным фенотипом, трансплантировали в спинной мозг мышей с СМА. В результате наблюдали некоторые изменения патологического фенотипа, а также увеличение продолжительности жизни больных мышей. Однако положительная динамика, по всей видимости, была обусловлена тем, что трансплантированные клетки продуцируют нейротрофические факторы [115].

Известно, что при СМА патологические изменения происходят и в других типах клеток, включая астроциты, сенсорные нейроны, шванновские клетки, скелетные мышечные волокна [120–124]. Влияют ли на прогрессирующую дегенерацию моторных нейронов сенсорные нейроны с мутацией в гене *SMN1*? Использование ИПСК от пациентов со СМА типа I помогает ответить на этот вопрос.

Линии ИПСК с генотипом СМА дифференцировали в сенсорные нейроны. При этом отмечали в них снижение кальциевого ответа на деполяризующие стимулы, однако выживаемость таких клеток не отличалась от клеток контрольной группы [125]. Совместное куль-

тивирование сенсорных нейронов от больных СМА и моторных нейронов от здоровых доноров не выявило значимого снижения числа мотонейронов, а также образования скоплений глутаматных транспортных везикул вблизи тел моторных нейронов или нейритов. Таким образом, показано, что в данной системе сенсорные нейроны, несущие мутацию *SMN1*, не вносят существенного вклада в гибель моторных нейронов с нормальным геном *SMN1*.

Применение современных методов геномной инженерии для создания искусственных модельных систем

Современные методы редактирования генома, основанные на технологиях ZFN (Zinc-finger Nucleases; нуклеазы, содержащие домен цинковые пальцы), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases; эффлекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9; короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга), позволяют получать искусственные модельные системы как *in vitro*, так и *in vivo*. С их помощью можно не только вводить ту или иную мутацию в геном исследуемого объекта, но и исправлять мутации [126–134].

В настоящее время технологии TALEN и CRISPR/Cas9 могут применяться в фундаментальных и трансляционных биомедицинских исследованиях и в экспериментах по проверке гипотез и принципов геномной и клеточной терапии. Помимо создания моделей для разработки подходов к лечению, искусственные нуклеазы могут быть использованы непосредственно в терапевтических целях. Одно из таких направлений – терапия хронических вирусных инфекций [135–138].

С помощью пары ZFN удалось исправить мутацию замены Ala4Val в гене *SOD1* в ИПСК [59]. Причем были получены гетерозиготные и гомозиготные клоны клеток (*SOD1*^{+/A4V} и *SOD1*^{+/+}). Эти клетки использовали для дальнейшего изучения функций мутантного белка *SOD1* и в качестве изогенного контроля.

Клеточная терапия БМН

Клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний предполагает замещение новыми здоровыми клетками поврежденной нервной ткани и восстановление нарушенных функций. Так, мотонейроны, полученные из ЭСК человека, трансплантировали в куриные эмбрионы, где они приживались и поддерживали свою клеточную специфичность, кроме того их аксоны выходили за пределы ЦНС и достигали своих периферических мышечных мишеней

Источники получения моторных нейронов

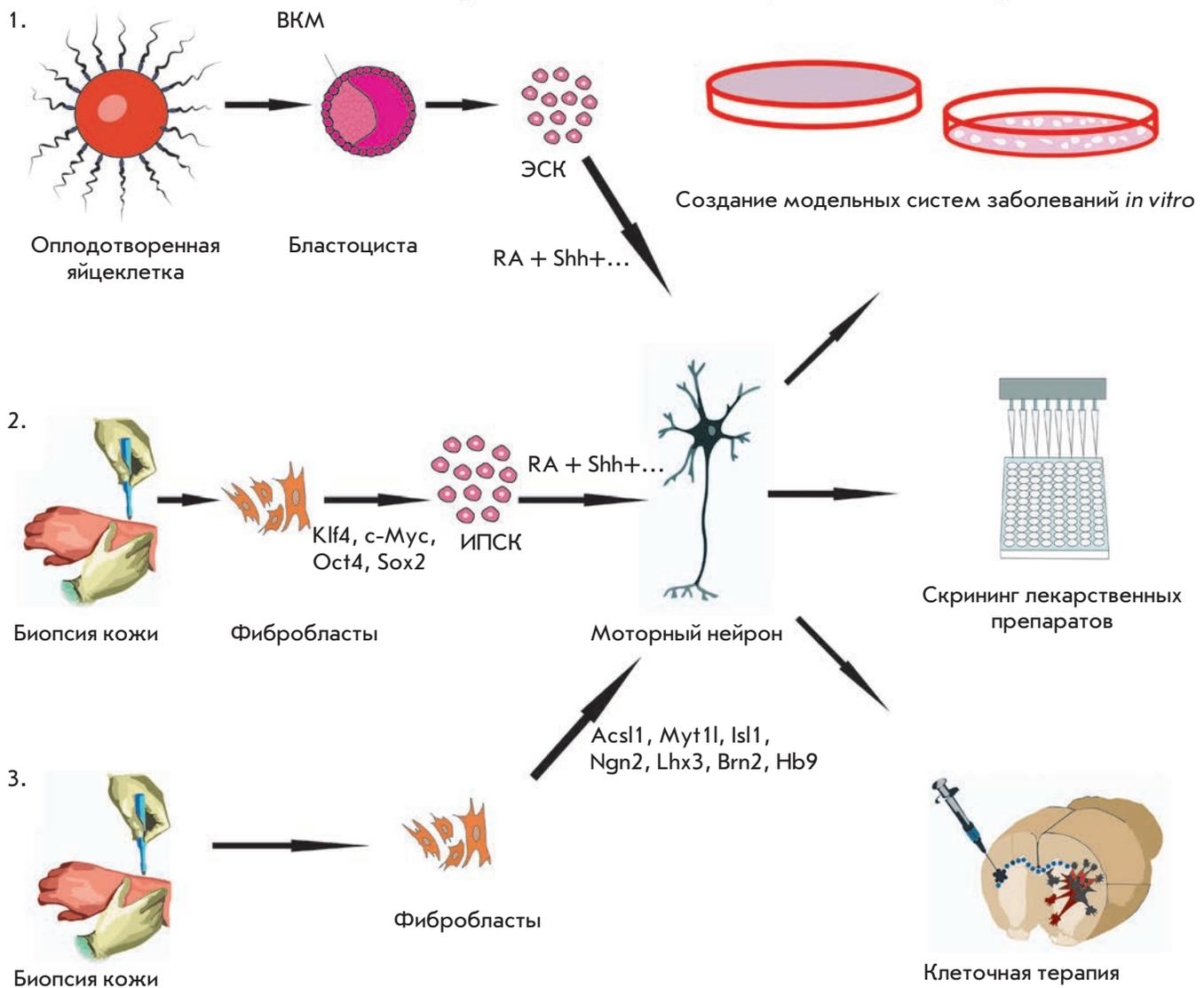


Рис. 3. Источники получения моторных нейронов. 1 – ЭСК, полученные из внутренней клеточной массы бластоцисты, можно дифференцировать в моторные нейроны, ключевую роль в данном процессе играют такие соединения, как RA и Shh. 2 – фибробласты человека, полученные из материала биопсии кожи, можно репрограммировать в ИПСК путем экспрессии в них таких факторов, как Klf4, c-Мyc, Oct4 и Sox2. Дифференцировку ИПСК в моторные нейроны производят способом, описанным для ЭСК. 3 – непосредственно из фибробластов можно получить моторные нейроны путем экспрессии в них семи факторов (Acs11, Myt11, Isl1, Ngn2, Lhx3, Brn2, Hb9)

[139]. Аналогичные клетки, трансплантированные в спинной мозг взрослых крыс, также приживались в чужеродной ткани. Через 6 месяцев после операции обнаруживалось некоторое количество клеток, экспрессирующих маркер мотонейронов – холин-аденозилтрансферазу. Большого эффекта позволяет достичь котрансплантация нейтральных стволовых клеток, секретирующих в пораженную область глиальный нейротрофический фактор, и дополни-

тельное введение этим животным ингибитора фосфодиэстеразы-4 и циклического дибутуриладенозинмонофосфата, веществ, которые стимулируют выход аксонов на периферию [140]. Стимулировать образование нервно-мышечных синапсов позволяет трансплантация моторных нейронов в дистальные концы периферических нервов у мыши [141–143]. При этом отмечается образование функциональных синапсов, сохраняющихся через 6–18 месяцев после

операции. А дополнительная электрическая стимуляция приживленных клеток обеспечивает реиннервацию атрофированных мышечных волокон [143].

Операции по пересадке моторных нейронов по-прежнему сопряжены с трудностями технического характера и иммунологическими реакциями. Однако трансплантация дифференцированных производных ИПСК позволяет избежать проблем тканевой несовместимости, наблюдаемых при использовании производных ЭСК. Кроме того, дальнейшего изучения требуют вопросы котрансплантации клеток микроокружения, формирования функциональных нервно-мышечных синапсов на периферии, повышения выживаемости и времени функционирования трансплантированных клеток.

Проблема направленной дифференцировки моторных нейронов и масштабирования экспериментов для проведения фармакологических исследований

В настоящее время получить моторные нейроны можно из трех источников (рис. 3):

- ЭСК;
- ИПСК;
- фибробластов.

Разработка протоколов быстрой и эффективной дифференцировки ЭСК и ИПСК чрезвычайно важна, поскольку именно дифференцированные производные этих клеток необходимы для широкомасштабного использования в фармакологических, токсикологических исследованиях и заместительной клеточной терапии. В настоящее время разработано большое число протоколов направленной дифференцировки культивируемых плюрипотентных клеток человека и мыши в моторные нейроны [71, 75, 115, 144–153]. Данная процедура включает два этапа. Первый этап – проведение нейрональной дифференцировки с формированием эмбрионидных телец или нейральных розеток. Этот этап проводится в среде для ЭСК с добавлением специфических факторов, направляющих дифференцировку в нейральном направлении. Второй этап – дифференцировка полученных нейральных предшественников в направлении моторных нейронов путем добавления в среду таких факторов, как RA (retinoic acid – ретиноевая кислота) и Shh (sonic hedgehog – сигнальный белок Hedgehog). Эффективность процедуры оценивают по экспрессии специфических маркеров, морфологии клеток, их электрофизиологической активности, а также путем ксенотрансплантации животным. Полученные клетки представляют собой смешанную популяцию. Обогатить ее моторными нейронами можно с помощью градиентного центрифугирования [115] или же протоколов с более высоким выходом требуемых клеток.

Протоколы, в которых используется индукция эмбрионидных телец с последующей обработкой RA/Shh, довольно трудоемкие, они занимают в общей сложности около 2 месяцев и дают относительно низкий выход моторных нейронов (10–40%). Метод направленного программирования, основанный на аденовирусной доставке трех специфических для мотонейронов факторов транскрипции, Ngn2, ISL1 и Lhx3, быстрее (мотонейроны из нейральных предшественников формируются в течение 11 дней) и эффективнее (популяция мотонейронов составляет порядка 60%). Недостатками такого метода являются:

- относительно небезопасные для дальнейшего использования этих клеток манипуляции с геномами, основанные на применении аденовирусов;
- значительные колебания количества получаемых на выходе мотонейронов, а также вариабельности их выживаемости.

Однако уже разработаны протоколы, позволяющие довольно быстро (в течение 20 дней) и с большой эффективностью (свыше 70%) получать моторные нейроны без использования аденовирусов [154].

Дальнейшие усилия должны быть направлены не только на поиск новых более эффективных методов дифференцировки, но и на стандартизацию параметров пассирования и культивирования клеток согласно существующим методам, а также на изучение способов направленной дифференцировки клеток в конкретные подтипы мотонейронов.

Проблема создания биобанков клеточных моделей

Для осуществления фармакологических, токсикологических исследований и клеточной терапии важнейшим условием является доступность клеточных образцов, полученных от больных редкими заболеваниями. Отсюда возникает острая необходимость в создании банков линий ЭСК и ИПСК человека. Подобная задача требует высокого уровня компетентности сотрудников, создания специализированной инфраструктуры, строгого контроля качества образцов. Мировое научное сообщество давно озабочено данной проблемой. Критерии, которым должны удовлетворять банки линий ЭСК и ИПСК человека, рассмотрены в новых программах, таких, как CCRM (<http://ccrm.ca/>), CIRM (<http://www.coriell.org/media-center/coriell-in-the-news/coriell-awarded-10mm-for-induced-pluripotent-stem-cell-program>), HiPSCi (<http://www.hipsci.org>) и StemBANCC (<http://www.stembancc.org/>).

Одним из возможных способов реализации этой важнейшей задачи может стать платформа на основе краудсорсинга (crowdsourcing – crowd – толпа и sourcing – использование ресурсов, т.е. мобилизации ресурсов посредством информационных

технологий с целью решения задач, стоящих перед бизнесом, государством и обществом в целом), как, например, это уже имеет место в таких ресурсах, как The Zebrafish Gene Collection, ADDGENE, PubMed и the Drosophila «Red Book». В США уже существует прообраз подобной организации, базой для которой являются NIH (the National Institutes of Health, в частности NCATS (National Center for Advanced Translational Science) и NIHCRM (the NIH Center for Regenerative Medicine)). В коллекциях трех организаций RUCDR Infinite Biologics (Rutgers), the Coriell Institute for Medical Research (Coriell) и Wisconsin Stem Cell Bank (WISC) уже имеются сотни клеточных линий ЭСК и ИПСК, полученных от различных институтов.

Таким образом, для создания биобанков клеточных моделей необходимо решить ряд вопросов. Первый связан с объединением усилий международного сообщества, направленных на то, чтобы исследователи всего мира имели свободный доступ к подобному биобанку. Немаловажной является проблема биологической безопасности, а также соответствие биобанка законодательным базам разных стран. Вторым вопросом – создание единой базы данных, в которой должны быть прописаны все необходимые характеристики клеточных линий. Третий вопрос связан с быстрым прогрессом в области клеточных технологий. Менее чем за 10 лет после своего создания технология ИПСК достигла такого уровня развития, что уже позволяет использовать эти клетки в доклинических исследованиях лекарственных препаратов, а также начать их применение в области регенеративной и персонализированной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема нейродегенеративных заболеваний и поиска способов их лечения становится одной из наиболее актуальных в связи с увеличением средней продолжительности жизни в развитых странах, поскольку большая часть этих болезней развивается у лиц пожилого и старческого возраста. Болезни моторных нейронов не занимают ведущей позиции в общей структуре смертности от нейродегенеративных заболеваний, но по тяжести течения и скорости летального исхода они являются безусловными лидерами. Боковой амиотрофический склероз (БАС)

приводит к прогрессирующей мышечной атрофии и смерти в результате дыхательной недостаточности в течение 2–5 лет, а наиболее тяжелая форма спинальной мышечной атрофии (СМА), болезнь Вердника–Гоффмана, приводит к мышечной атрофии, параличу и смерти больных детей в течение первых 2 лет жизни.

Моделирование БМН в системах *in vivo* на таких организмах, как нематода, дрозофила, лабораторные мыши и крысы, существенно расширило наши представления о причинах и механизмах патогенеза БМН, позволило выявить ряд химических соединений, которые можно будет использовать в терапии этих болезней. Однако на генетическом и фенотипическом уровне подобные модели сильно отличаются от того, что наблюдается при БМН у человека. Поэтому для получения релевантных модельных систем на сегодняшний день активно используют дифференцированные производные ЭСК и ИПСК. С их помощью можно не только изучать особенности заболеваний на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях, но и использовать эти клетки в дальнейшем для заместительной терапии и скрининга новых лекарственных средств. Наибольшие перспективы связывают с возможностью трансплантации производных ИПСК, поскольку эти клетки аутологичны предполагаемому донору, что позволяет избежать иммунологических реакций отторжения и способствует развитию и внедрению нового этапа современной медицины – эры персонализированной медицины.

Важнейшая задача, которую необходимо решить на пути к достижению этого этапа, – это создание общедоступных банков линий ЭСК и ИПСК, содержащих максимально полную информацию о каждой клеточной линии. На сегодняшний день в этом направлении наиболее активно работают Национальные институты здоровья в США и ряд организаций в некоторых развитых странах. Однако для создания наиболее полного банка линий ЭСК и ИПСК необходимо объединение усилий всего мирового научного сообщества, в том числе научных организаций и учреждений Российской Федерации. ●

Работа финансировалась в рамках программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2.1.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen P.M., Al-Chalabi A. // Nat. Rev. Neurol. 2011. V. 7. № 11. P. 603–615.
2. Faravelli I., Bucchia M., Rinchetti P., Nizzardo M., Simone C., Frattini E., Corti S. // Stem Cell Res. Ther. 2014. V. 5. № 4. P. 87.
3. Simone C., Nizzardo M., Rizzo F., Ruggieri M., Riboldi G., Salani S., Bucchia M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. // Stem Cell Repts. 2014. V. 3. № 2. P. 297–311.
4. Boiani M., Scholer H.R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. № 11. P. 872–884.
5. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // Nature. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
6. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.

7. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
8. Lunn J.S., Sakowski S.A., Federici T., Glass J.D., Boulis N.M., Feldman E.L. // *Regen. Med*. 2011. V. 6. № 2. P. 201–213.
9. Amemori T., Romanyuk N., Jendelova P., Herynek V., Turnovcova K., Prochazka P., Kapcalova M., Cocks G., Price J., Sykova E. // *Stem Cell Res. Ther*. 2013. V. 4. № 3. P. 68.
10. Rossi F., Cattaneo E. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2002. V. 3. № 5. P. 401–409.
11. Rosser A.E., Zietlow R., Dunnett S.B. // *Curr. Opin. Neurol*. 2007. V. 20. № 6. P. 688–692.
12. Klein S.M., Behrstock S., Mchugh J., Hoffmann K., Wallace K., Suzuki M., Aebischer P., Svendsen C.N. // *Hum. Gene Ther*. 2005. V. 16. № 4. P. 509–521.
13. Mulder D.W. // *Adv. Neurol*. 1982. V. 36. P. 15–22.
14. Gordon P.H. // *Aging Dis*. 2013. V. 4. № 5. P. 295–310.
15. Mcguire V., Longstreth W.T., Jr., Koepsell T.D., van Belle G. // *Neurology*. 1996. V. 47. № 2. P. 571–573.
16. Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chio A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010. V. 81. № 4. P. 385–390.
17. Marin B., Hamidou B., Couratier P., Nicol M., Delzor A., Raymondeau M., Druet-Cabanac M., Lautrette G., Boumediene F., Preux P.M. // *Eur. J. Neurol*. 2014. V. 21. № 10. P. 1292–1300. e1278–9.
18. Kurtzke J.F. // *Adv. Neurol*. 1991. V. 56. P. 245–270.
19. Papapetropoulos S. // *Neurochem. Int*. 2007. V. 50. № 7–8. P. 998–1003.
20. Caller T.A., Field N.C., Chipman J.W., Shi X., Harris B.T., Stommel E.W. // *Amyotroph. Lateral Scler*. 2012. V. 13. № 1. P. 25–32.
21. Vinceti M., Bottecchi I., Fan A., Finkelstein Y., Mandrioli J. // *Rev. Environ. Health*. 2012. V. 27. № 1. P. 19–41.
22. Wang H., O'reilly E.J., Weisskopf M.G., Logroscino G., McCullough M.L., Thun M.J., Schatzkin A., Kolonel L.N., Ascherio A. // *Arch. Neurol*. 2011. V. 68. № 2. P. 207–213.
23. Pupillo E., Messina P., Logroscino G., Zoccollella S., Chio A., Calvo A., Corbo M., Lunetta C., Micheli A., Millul A., et al. // *Eur. J. Neurol*. 2012. V. 19. № 12. P. 1509–1517.
24. Huisman M.H., Seelen M., De Jong S.W., Dorresteyn K.R., van Doormaal P.T., van Der Kooi A.J., De Visser M., Schelhaas H.J., van Den Berg L.H., Veldink J.H. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2013. V. 84. № 9. P. 976–981.
25. Macgowan D.J., Scelsa S.N., Waldron M. // *Neurology*. 2001. V. 57. № 6. P. 1094–1097.
26. Steele A.J., Al-Chalabi A., Ferrante K., Cudkowicz M.E., Brown R.H., Jr., Garson J.A. // *Neurology*. 2005. V. 64. № 3. P. 454–458.
27. Abel O., Powell J.F., Andersen P.M., Al-Chalabi A. // *Hum. Mutat*. 2012. V. 33. № 9. P. 1345–1351.
28. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M., Finch N.A., Flynn H., Adamson J., et al. // *Neuron*. 2011. V. 72. № 2. P. 245–256.
29. Majounie E., Renton A.E., Mok K., Dopper E.G., Waite A., Rollinson S., Chio A., Restagno G., Nicolaou N., Simon-Sanchez J., et al. // *Lancet Neurol*. 2012. V. 11. № 4. P. 323–330.
30. Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simon-Sanchez J., Rollinson S., Gibbs J.R., Schymick J.C., Laaksovirta H., van Swieten J.C., Myllykangas L., et al. // *Neuron*. 2011. V. 72. № 2. P. 257–268.
31. Rosen D.R. // *Nature*. 1993. V. 364. № 6435. P. 362.
32. Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., et al. // *Science*. 2008. V. 319. № 5870. P. 1668–1672.
33. Vance C., Rogelj B., Hortobagyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., et al. // *Science*. 2009. V. 323. № 5918. P. 1208–1211.
34. Kwiatkowski T.J., Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vandenburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., et al. // *Science*. 2009. V. 323. № 5918. P. 1205–1208.
35. Greenway M.J., Andersen P.M., Russ C., Ennis S., Cashman S., Donaghy C., Patterson V., Swingler R., Kieran D., Prehn J., et al. // *Nat. Genet*. 2006. V. 38. № 4. P. 411–413.
36. Maruyama H., Morino H., Ito H., Izumi Y., Kato H., Watanabe Y., Kinoshita Y., Kamada M., Nodera H., Suzuki H., et al. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 223–226.
37. Johnson J.O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Gibbs J.R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., et al. // *Neuron*. 2010. V. 68. № 5. P. 857–864.
38. Mackenzie I.R., Rademakers R., Neumann M. // *Lancet Neurol*. 2010. V. 9. № 10. P. 995–1007.
39. Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Cleveland D.W. // *Hum. Mol. Genet*. 2010. V. 19. № R1. P. R46–64.
40. Halawani D., Latterich M. // *Mol. Cell*. 2006. V. 22. № 6. P. 713–717.
41. Al-Sarraj S., King A., Troakes C., Smith B., Maekawa S., Bodi I., Rogelj B., Al-Chalabi A., Hortobagyi T., Shaw C.E. // *Acta Neuropathol*. 2011. V. 122. № 6. P. 691–702.
42. Miller R.G., Mitchell J.D., Lyon M., Moore D.H. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. № 1. P. CD001447.
43. Feiguin F., Godena V.K., Romano G., D'ambrogio A., Klima R., Baralle F.E. // *FEBS Lett*. 2009. V. 583. № 10. P. 1586–1592.
44. Laird A.S., van Hoecke A., De Muynck L., Timmers M., van Den Bosch L., van Damme P., Robberecht W. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 10. P. e13368.
45. Kraemer B.C., Schuck T., Wheeler J.M., Robinson L.C., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Schellenberg G.D. // *Acta Neuropathol*. 2010. V. 119. № 4. P. 409–419.
46. Johnson B.S., Snead D., Lee J.J., McCaffery J.M., Shorter J., Gitler A.D. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. № 30. P. 20329–20339.
47. Arnold E.S., Ling S.C., Huelga S.C., Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Ditsworth D., Kordasiewicz H.B., Mcalonis-Downes M., Platoshyn O., Parone P.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 8. P. E736–745.
48. Stallings N.R., Puttapparthi K., Luther C.M., Burns D.K., Elliott J.L. // *Neurobiol. Dis*. 2010. V. 40. № 2. P. 404–414.
49. Wegorzewska I., Bell S., Cairns N.J., Miller T.M., Baloh R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 44. P. 18809–18814.
50. Wils H., Kleinberger G., Janssens J., Pereson S., Joris G., Cuijt I., Smits V., Ceuterick-De Groote C., Van Broeckhoven C., Kumar-Singh S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 8. P. 3858–3863.
51. Zhou H., Huang C., Chen H., Wang D., Landel C.P., Xia P.Y., Bowser R., Liu Y.J., Xia X.G. // *PLoS Genet*. 2010. V. 6. № 3. P. e1000887.
52. Uchida A., Sasaguri H., Kimura N., Tajiri M., Ohkubo T., Ono F., Sakaue F., Kanai K., Hirai T., Sano T., et al. // *Brain*. 2012. V. 135. Pt 3. P. 833–846.
53. Hicks G.G., Singh N., Nashabi A., Mai S., Bozek G., Klewes L., Arapovic D., White E.K., Koury M.J., Oltz E.M., et al. // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. № 2. P. 175–179.
54. Kuroda M., Sok J., Webb L., Baechtold H., Urano F., Yin Y., Chung P., De Rooij D.G., Akhmedov A., Ashley T., et al. // *EMBO J*. 2000. V. 19. № 3. P. 453–462.
55. Fujii R., Okabe S., Urushido T., Inoue K., Yoshimura A., Tachibana T., Nishikawa T., Hicks G.G., Takumi T. // *Curr. Biol*. 2005. V. 15. № 6. P. 587–593.
56. Mitchell J.C., Mcgoldrick P., Vance C., Hortobagyi T.,

- Sreedharan J, Rogelj B, Tudor E.L., Smith B.N., Klaseen C., Miller C.C., et al. // *Acta Neuropathol.* 2013. V. 125. № 2. P. 273–288.
57. Huang C., Zhou H., Tong J., Chen H., Liu Y.J., Wang D., Wei X., Xia X.G. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 3. P. e1002011.
58. Chen H., Qian K., Du Z., Cao J., Petersen A., Liu H., Blackburn L.W.T., Huang C.L., Errigo A., Yin Y., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 14. № 6. P. 796–809.
59. Kiskinis E., Sandoe J., Williams L.A., Boulting G.L., Moccia R., Wainger B.J., Han S., Peng T., Thams S., Mikkilineni S., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 14. № 6. P. 781–795.
60. Wainger B.J., Kiskinis E., Mellin C., Wiskow O., Han S.S., Sandoe J., Perez N.P., Williams L.A., Lee S., Boulting G., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 7. № 1. P. 1–11.
61. Yang Y.M., Gupta S.K., Kim K.J., Powers B.E., Cerqueira A., Wainger B.J., Ngo H.D., Rosowski K.A., Schein P.A., Ackeifi C.A., et al. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 6. P. 713–726.
62. Koh S.H., Baek W., Kim S.H. // *Neurol. Res. Int.* 2011. V. 2011. P. 205761.
63. Hetman M., Xia Z. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 2000. V. 60. № 4. P. 531–545.
64. Linseman D.A., Butts B.D., Precht T.A., Phelps R.A., Le S.S., Laessig T.A., Bouchard R.J., Florez-Mcclure M.L., Heidenreich K.A. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 44. P. 9993–10002.
65. Serio A., Bilican B., Barmada S.J., Ando D.M., Zhao C., Siller R., Burr K., Haghi G., Story D., Nishimura A.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 12. P. 4697–4702.
66. Di Giorgio F.P., Carrasco M.A., Siao M.C., Maniatis T., Eggan K. // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. № 5. P. 608–614.
67. Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W. // *Neuron.* 2013. V. 79. № 3. P. 416–438.
68. Bilican B., Serio A., Barmada S.J., Nishimura A.L., Sullivan G.J., Carrasco M., Phatnani H.P., Puddifoot C.A., Story D., Fletcher J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 15. P. 5803–5808.
69. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 145. P. 145ra104.
70. Nishimura A.L., Shum C., Scotter E.L., Abdelgany A., Sardone V., Wright J., Lee Y.B., Chen H.J., Bilican B., Carrasco M., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. P. e91269.
71. Sareen D., O'rourke J.G., Meera P., Muhammad A.K., Grant S., Simpkinson M., Bell S., Carmona S., Ornelas L., Sahabian A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 208. P. 208ra149.
72. Buratti E., Brindisi A., Giombi M., Tisminetzky S., Ayala Y.M., Baralle F.E. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 45. P. 37572–37584.
73. Kim H.J., Kim N.C., Wang Y.D., Scarborough E.A., Moore J., Diaz Z., Maclea K.S., Freibaum B., Li S., Molliex A., et al. // *Nature.* 2013. V. 495. № 7442. P. 467–473.
74. Xu Z., Poidevin M., Li X., Li Y., Shu L., Nelson D.L., Li H., Hales C.M., Gearing M., Wingo T.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 19. P. 7778–7783.
75. Burkhardt M.F., Martinez F.J., Wright S., Ramos C., Volfson D., Mason M., Garnes J., Dang V., Lievers J., Shoukat-Mumtaz U., et al. // *Mol. Cell Neurosci.* 2013. V. 56. P. 355–364.
76. Burghes A.H., Beattie C.E. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 8. P. 597–609.
77. Lunn M.R., Wang C.H. // *Lancet.* 2008. V. 371. № 9630. P. 2120–2133.
78. Monani U.R. // *Neuron.* 2005. V. 48. № 6. P. 885–896.
79. Emery A.E. // *J. Med. Genet.* 1971. V. 8. № 4. P. 481–495.
80. Hahnen E., Forker R., Marke C., Rudnik-Schoneborn S., Schonling J., Zerres K., Wirth B. // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. № 10. P. 1927–1933.
81. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M., et al. // *Cell.* 1995. V. 80. № 1. P. 155–165.
82. Burglen L., Lefebvre S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Cruaud C., Munnich A., Melki J. // *Genomics.* 1996. V. 32. № 3. P. 479–482.
83. Cartegni L., Hastings M.L., Calarco J.A., De Stanchina E., Krainer A.R. // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 78. № 1. P. 63–77.
84. Kashima T., Manley J.L. // *Nat. Genet.* 2003. V. 34. № 4. P. 460–463.
85. Campbell L., Potter A., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. № 1. P. 40–50.
86. Mailman M.D., Heinz J.W., Papp A.C., Snyder P.J., Sedra M.S., Wirth B., Burghes A.H., Prior T.W. // *Genet. Med.* 2002. V. 4. № 1. P. 20–26.
87. Rodrigues N.R., Owen N., Talbot K., Patel S., Muntoni F., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K.E. // *J. Med. Genet.* 1996. V. 33. № 2. P. 93–96.
88. Zheleznyakova G.Y., Kiselev A.V., Vakhlovsky V.G., Rask-Andersen M., Chavan R., Egorova A.A., Schiöth H.B., Baranov V.S. // *BMC Med. Genet.* 2011. V. 12. P. 96.
89. Munsat T.L., Davies K.E. // *Neuromuscul. Disord.* 1992. V. 2. № 5–6. P. 423–428.
90. Akten B., Kye M.J., Hao Le T., Wertz M.H., Singh S., Nie D., Huang J., Merianda T.T., Twiss J.L., Beattie C.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10337–10342.
91. Mcwhorter M.L., Monani U.R., Burghes A.H., Beattie C.E. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. № 5. P. 919–931.
92. Meister G., Buhler D., Pillai R., Lottspeich F., Fischer U. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. № 11. P. 945–949.
93. Pellizzoni L., Yong J., Dreyfuss G. // *Science.* 2002. V. 298. № 5599. P. 1775–1779.
94. Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., Kroning A.K., Karle K., Monani U.R., Sendtner M. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 163. № 4. P. 801–812.
95. Pellizzoni L. // *EMBO Rep.* 2007. V. 8. № 4. P. 340–345.
96. Eggert C., Chari A., Lagerbauer B., Fischer U. // *Trends Mol. Med.* 2006. V. 12. № 3. P. 113–121.
97. Gabanella F., Butchbach M.E., Saieva L., Carissimi C., Burghes A.H., Pellizzoni L. // *PLoS One.* 2007. V. 2. № 9. P. e921.
98. Giavazzi A., Setola V., Simonati A., Battaglia G. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006. V. 65. № 3. P. 267–277.
99. Carrel T.L., Mcwhorter M.L., Workman E., Zhang H., Wolstencroft E.C., Lorson C., Bassell G.J., Burghes A.H., Beattie C.E. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 43. P. 11014–11022.
100. Fan L., Simard L.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 14. P. 1605–1614.
101. Schrank B., Gotz R., Gunnensen J.M., Ure J.M., Toyka K.V., Smith A.G., Sendtner M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 18. P. 9920–9925.
102. Chan Y.B., Miguel-Aliaga I., Franks C., Thomas N., Trulzsch B., Sattelle D.B., Davies K.E., van Den Heuvel M. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. № 12. P. 1367–1376.
103. Frugier T., Tiziano F.D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M., Melki J. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 849–858.
104. Cifuentes-Diaz C., Frugier T., Tiziano F.D., Lacene E., Roblot N., Joshi V., Moreau M.H., Melki J. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 152. № 5. P. 1107–1114.
105. Vitte J.M., Davoult B., Roblot N., Mayer M., Joshi V., Courageot S., Tronche F., Vadrot J., Moreau M.H., Kemeny F., et al. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 165. № 5. P. 1731–1741.
106. Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J., Wu M.H., Wang N.M., Tsai C.H., Li H. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 1. P. 66–70.

107. Monani U.R., Sendtner M., Coovert D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossoll W., Prior T.W., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 3. P. 333–339.
108. Gavrilina T.O., MCGovern V.L., Workman E., Crawford T.O., Gogliotti R.G., Didonato C.J., Monani U.R., Morris G.E., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 8. P. 1063–1075.
109. Sleigh J.N., Buckingham S.D., Esmaceli B., Viswanathan M., Cuppen E., Westlund B.M., Sattelle D.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 2. P. 245–260.
110. Coque E., Raoul C., Bowerman M. // *Front Neurosci.* 2014. V. 8. P. 271.
111. Zheleznyakova G.Y., Voisin S., Kiselev A.V., Sallman Almen M., Xavier M.J., Maretina M.A., Tishchenko L.I., Fredriksson R., Baranov V.S., Schioth H.B. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2013. V. 21. № 9. P. 988–993.
112. Chang H.C., Dimlich D.N., Yokokura T., Mukherjee A., Kankel M.W., Sen A., Sridhar V., Fulga T.A., Hart A.C., van Vactor D., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 9. P. e3209.
113. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., Mattis V.B., Lorson C.L., Thomson J.A., Svendsen C.N. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7227. P. 277–280.
114. Sareen D., Ebert A.D., Heins B.M., MCGivern J.V., Ornelas L., Svendsen C.N. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 6. P. e39113.
115. Corti S., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Nardini M., Ronchi D., Donadoni C., Salani S., Riboldi G., Magri F., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 165. P. 165ra162.
116. Liu Q., Dreyfuss G. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 14. P. 3555–3565.
117. Coovert D.D., Le T.T., McAndrew P.E., Strasswimmer J., Crawford T.O., Mendell J.R., Coulson S.E., Androphy E.J., Prior T.W., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 8. P. 1205–1214.
118. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G., Melki J. // *Nat. Genet.* 1997. V. 16. № 3. P. 265–269.
119. Young P.J., Le T.T., Thi Man N., Burghes A.H., Morris G.E. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 256. № 2. P. 365–374.
120. Gogliotti R.G., Quinlan K.A., Barlow C.B., Heier C.R., Heckman C.J., Didonato C.J. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 11. P. 3818–3829.
121. Jablonka S., Karle K., Sandner B., Andreassi C., Von Au K., Sendtner M. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 3. P. 511–518.
122. Ling K.K., Lin M.Y., Zing B., Feng Z., Ko C.P. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 11. P. e15457.
123. Voigt T., Meyer K., Baum O., Schumperli D. // *Neuromuscul Disord.* 2010. V. 20. № 11. P. 744–752.
124. Murray L.M., Beauvais A., Bhanot K., Kothary R. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 49C. P. 57–67.
125. Schwab A.J., Ebert A.D. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e103112.
126. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 12. P. e82.
127. Horii T., Tamura D., Morita S., Kimura M., Hatada I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 10. P. 19774–19781.
128. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., van Der Ent C.K., et al. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 13. № 6. P. 653–658.
129. Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.L. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 1. P. 220–228.
130. Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X., Zhu X., Xiong J.W., Xi J.J. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 4. P. 465–472.
131. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
132. Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 681–683.
133. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., Dicarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
134. Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 686–688.
135. Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Jouvenot Y., Dekelver R.C., Gregory P.D., Urnov F.D., Holmes M.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 9. P. 3055–3060.
136. Bloom K., Ely A., Mussolino C., Cathomen T., Arbuthnot P. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 10. P. 1889–1897.
137. Schiffer J.T., Aubert M., Weber N.D., Mintzer E., Stone D., Jerome K.R. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 17. P. 8920–8936.
138. Holt N., Wang J., Kim K., Friedman G., Wang X., Taupin V., Crooks G.M., Kohn D.B., Gregory P.D., Holmes M.C., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 839–847.
139. Lee H., Shamy G.A., Elkabetz Y., Schofield C.M., Harrision N.L., Panagiotakos G., Socci N.D., Tabar V., Studer L. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 8. P. 1931–1939.
140. Deshpande D.M., Kim Y.S., Martinez T., Carmen J., Dike S., Shats I., Rubin L.L., Drummond J., Krishnan C., Hoke A., et al. // *Ann. Neurol.* 2006. V. 60. № 1. P. 32–44.
141. Craff M.N., Zeballos J.L., Johnson T.S., Ranka M.P., Howard R., Motarjem P., Randolph M.A., Winograd J.M. // *Plast Reconstr. Surg.* 2007. V. 119. № 1. P. 235–245.
142. Kubo T., Randolph M.A., Groger A., Winograd J.M. // *Plast Reconstr. Surg.* 2009. V. 123. № 2 Suppl. P. 139S–148S.
143. Yohn D.C., Miles G.B., Rafuse V.F., Brownstone R.M. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 47. P. 12409–12418.
144. Reinhardt P., Glatza M., Hemmer K., Tsytsyura Y., Thiel C.S., Hoing S., Moritz S., Parga J.A., Wagner L., Bruder J.M., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e59252.
145. Amoroso M.W., Croft G.F., Williams D.J., O'keeffe S., Carrasco M.A., Davis A.R., Roybon L., Oakley D.H., Maniatis T., Henderson C.E., et al. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 2. P. 574–586.
146. Boulting G.L., Kiskinis E., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., Wainger B.J., Williams D.J., Kahler D.J., Yamaki M., Davidow L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 3. P. 279–286.
147. Hester M.E., Murtha M.J., Song S., Rao M., Miranda C.J., Meyer K., Tian J., Boulting G., Schaffer D.V., Zhu M.X., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 10. P. 1905–1912.
148. Hu B.Y., Du Z.W., Zhang S.C. // *Nat-Protoc.* 2009. V. 4. № 11. P. 1614–1622.
149. Karumbayaram S., Novitch B.G., Patterson M., Umbach J.A., Richter L., Lindgren A., Conway A.E., Clark A.T., Goldman S.A., Plath K., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 4. P. 806–811.
150. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. // *Cell.* 2002. V. 110. № 3. P. 385–397.
151. Takazawa T., Croft G.F., Amoroso M.W., Studer L., Wichterle H., Macdermott A.B. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e40154.
152. Wada T., Honda M., Minami I., Tooi N., Amagai Y., Nakatsuji N., Aiba K. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 8. P. e6722.
153. Zeng H., Guo M., Martins-Taylor K., Wang X., Zhang Z., Park J.W., Zhan S., Kronenberg M.S., Lichtler A., Liu H.X., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 7. P. e11853.
154. Qu Q., Li D., Louis K.R., Li X., Yang H., Sun Q., Crandall S.R., Tsang S., Zhou J., Cox C.L., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3449.
155. Lu L., Li Y., Kim S.M., Bossuyt W., Liu P., Qiu Q., Wang Y.,

- Halder G., Finegold M.J., Lee J.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 4. P. 1437–1442.
156. Bastow E.L., Gourlay C.W., Tuite M.F. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. № 5. P. 1482–1487.
157. Couthouis J., Hart M.P., Shorter J., Dejesus-Hernandez M., Erion R., Oristano R., Liu A.X., Ramos D., Jethava N., Hosangadi D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 52. P. 20881–20890.
158. Martins D., English A.M. // *Redox Biol.* 2014. V. 2. P. 632–639.
159. Oeda T., Shimohama S., Kitagawa N., Kohno R., Imura T., Shibasaki H., Ishii N. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 19. P. 2013–2023.
160. Vaccaro A., Tauffenberger A., Aggad D., Rouleau G., Drapeau P., Parker J.A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. P. e31321.
161. Gidalevitz T., Krupinski T., Garcia S., Morimoto R.I. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000399.
162. Wang J., Farr G.W., Hall D.H., Li F., Furtak K., Dreier L., Horwich A.L. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 1. P. e1000350.
163. Ash P.E., Zhang Y.J., Roberts C.M., Saldi T., Hutter H., Buratti E., Petrucelli L., Link C.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 16. P. 3206–3218.
164. Liachko N.F., Guthrie C.R., Kraemer B.C. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 48. P. 16208–16219.
165. Watson M.R., Lagow R.D., Xu K., Zhang B., Bonini N.M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 36. P. 24972–24981.
166. Lanson N.A., Jr., Maltare A., King H., Smith R., Kim J.H., Taylor J.P., Lloyd T.E., Pandey U.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 13. P. 2510–2523.
167. Wang J.W., Brent J.R., Tomlinson A., Shneider N.A., McCabe B.D. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 10. P. 4118–4126.
168. Xia R., Liu Y., Yang L., Gal J., Zhu H., Jia J. // *Mol. Neurodegener.* 2012. V. 7. P. 10.
169. Miguel L., Avequin T., Delarue M., Feuillette S., Frebourg T., Campion D., Lecourtois M. // *Neurobiol. Aging*. 2012. V. 33. № 5. P. 1008. e1–15.
170. Li Y., Ray P., Rao E.J., Shi C., Guo W., Chen X., Woodruff E.A., 3rd, Fushimi K., Wu J.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 7. P. 3169–3174.
171. Lu Y., Ferris J., Gao F.B. // *Mol. Brain*. 2009. V. 2. P. 30.
172. Hanson K.A., Kim S.H., Wassarman D.A., Tibbetts R.S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 15. P. 11068–11072.
173. Elden A.C., Kim H.J., Hart M.P., Chen-Plotkin A.S., Johnson B.S., Fang X., Armarkola M., Geser F., Greene R., Lu M.M., et al. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7310. P. 1069–1075.
174. Ramesh T., Lyon A.N., Pineda R.H., Wang C., Janssen P.M., Canan B.D., Burghes A.H., Beattie C.E. // *Dis. Model Mech.* 2010. V. 3. № 9–10. P. 652–662.
175. Bosco D.A., Lemay N., Ko H.K., Zhou H., Burke C., Kwiatkowski T.J., Jr., Sapp P., Mckenna-Yasek D., Brown R.H., Jr., Hayward L.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 21. P. 4160–4175.
176. Kabashi E., Bercier V., Lissouba A., Liao M., Brustein E., Rouleau G.A., Drapeau P. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 8. P. e1002214.
177. Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y., Dal Canto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X., et al. // *Science*. 1994. V. 264. № 5166. P. 1772–1775.
178. Deng H.X., Shi Y., Furukawa Y., Zhai H., Fu R., Liu E., Gorrie G.H., Khan M.S., Hung W.Y., Bigio E.H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 18. P. 7142–7147.
179. Wong P.C., Pardo C.A., Borchelt D.R., Lee M.K., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sisodia S.S., Cleveland D.W., Price D.L. // *Neuron*. 1995. V. 14. № 6. P. 1105–1116.
180. Chang-Hong R., Wada M., Koyama S., Kimura H., Arawaka S., Kawanami T., Kurita K., Kadoya T., Aoki M., Itoyama Y., et al. // *Exp. Neurol.* 2005. V. 194. № 1. P. 203–211.
181. Wang J., Xu G., Gonzales V., Coonfield M., Fromholt D., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. // *Neurobiol. Dis.* 2002. V. 10. № 2. P. 128–138.
182. Wang J., Slunt H., Gonzales V., Fromholt D., Coonfield M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. № 21. P. 2753–2764.
183. Wang L., Deng H.X., Grisotti G., Zhai H., Siddique T., Roos R.P. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 9. P. 1642–1651.
184. Wang J., Ma J.H., Giffard R.G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 38. № 8. P. 1112–1118.
185. Deng H.X., Jiang H., Fu R., Zhai H., Shi Y., Liu E., Hirano M., Dal Canto M.C., Siddique T. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 15. P. 2310–2319.
186. Jonsson P.A., Graffmo K.S., Andersen P.M., Brannstrom T., Lindberg M., Oliveberg M., Marklund S.L. // *Brain*. 2006. V. 129. Pt 2. P. 451–464.
187. Watanabe Y., Yasui K., Nakano T., Doi K., Fukada Y., Kitayama M., Ishimoto M., Kurihara S., Kawashima M., Fukuda H., et al. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. V. 135. № 1–2. P. 12–20.
188. Nagai M., Aoki M., Miyoshi I., Kato M., Pasinelli P., Kasai N., Brown R.H., Jr., Itoyama Y. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 23. P. 9246–9254.
189. Howland D.S., Liu J., She Y., Goad B., Maragakis N.J., Kim B., Erickson J., Kulik J., Devito L., Psaltis G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 3. P. 1604–1609.
190. Xu Y.F., Gendron T.F., Zhang Y.J., Lin W.L., D'Alton S., Sheng H., Casey M.C., Tong J., Knight J., Yu X., et al. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 32. P. 10851–10859.
191. Shan X., Chiang P.M., Price D.L., Wong P.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 37. P. 16325–16330.
192. Igaz L.M., Kwong L.K., Lee E.B., Chen-Plotkin A., Swanson E., Unger T., Malunda J., Xu Y., Winton M.J., Trojanowski J.Q., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 2. P. 726–738.
193. Awano T., Johnson G.S., Wade C.M., Katz M.L., Johnson G.C., Taylor J.F., Perloski M., Biagi T., Baranowska I., Long S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 8. P. 2794–2799.
194. Coates J.R., Wininger F.A. // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2010. V. 40. № 5. P. 929–950.
195. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Njakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science*. 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.
196. Chestkov I.V., Vasilieva E.A., Illarionov S.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 1. P. 54–60.
197. Owen N., Doe C.L., Mellor J., Davies K.E. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 675–684.
198. Paushkin S., Charroux B., Abel L., Perkinson R.A., Pellizzoni L., Dreyfuss G. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 31. P. 23841–23846.
199. Hannus S., Buhler D., Romano M., Seraphin B., Fischer U. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 663–674.
200. Miguel-Aliaga I., Culetto E., Walker D.S., Baylis H.A., Sattelle D.B., Davies K.E. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 12. P. 2133–2143.
201. Briese M., Esmaeili B., Fraboulet S., Burt E.C., Christodoulou S., Towers P.R., Davies K.E., Sattelle D.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 1. P. 97–104.
202. Rajendra T.K., Gonsalvez G.B., Walker M.P., Shpargel K.B., Salz H.K., Matera A.G. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 176. № 6. P. 831–841.
203. Workman E., Saieva L., Carrel T.L., Crawford T.O., Liu D., Lutz C., Beattie C.E., Pellizzoni L., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 12. P. 2215–2229.

УДК 577.112, 577.181

Строение и биологические функции β -шпилечных антимикробных пептидов

П. В. Пантелеев, И. А. Болосов, С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова*

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

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 12.11.2014

РЕФЕРАТ В настоящее время сформировано представление об антимикробных пептидах (АМП) как о молекулярных факторах системы врожденного иммунитета, обеспечивающих универсальный и эволюционно древний способ защиты человека, животных и высших растений от инфекции. Обзор посвящен рассмотрению особенностей строения, биосинтеза и биологических функций АМП, пространственная структура которых представляет собой β -шпильку. Представители данного семейства АМП относятся к числу наиболее активных молекул животного происхождения с антибиотическими свойствами. Благодаря широкому спектру активности и устойчивости к факторам внутренней среды организма природные β -шпилечные АМП и их аналоги могут стать основой для создания лекарственных препаратов, способных найти применение в различных областях медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, β -шпилечная структура.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; ЛПС – липополисахарид; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) – экспрессирующийся в печени антимикробный пептид-1, гепцидин; MRSA – метициллин-устойчивый золотистый стафилококк.

ВВЕДЕНИЕ

Система врожденного иммунитета обеспечивает немедленную защиту организма в ответ на внедрение патогена благодаря большому числу молекулярных факторов, реализующих рекогносцировочные и эффекторные механизмы ее функционирования, к которым относятся молекулы клеточной адгезии, паттернраспознающие, в том числе Toll-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы, пептидогликан-распознающие белки, лектины, пентраксины, компоненты системы комплемента, липополисахаридсвязывающий белок, лизоцим, лактоферрин, цитокины, хемокины и многие другие, регулирующие инициацию и течение защитных реакций [1]. Наряду с перечисленными белковыми факторами врожденного иммунитета особую роль в защите организма от инфекции играют эндогенные антимикробные пептиды (АМП), продуцируемые позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями. АМП в основном синтезируются на рибосомах в составе белков-предшественников и в процессе созревания могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Зрелые АМП, содержащие от нескольких единиц до нескольких десятков аминокислотных остатков, обладают, как правило, основными свойствами благодаря высокому содержанию ар-

гинина и лизина [2]. Изначально АМП, выделенные из гемолимфы насекомых, кожных секретов амфибий и фагоцитов млекопитающих, обратили на себя внимание благодаря способности подавлять рост различных микроорганизмов. По мере обнаружения все новых и новых АМП стало очевидным, что это универсальные и эволюционно древние элементы системы врожденного иммунитета. Позднее, наряду с фактами, свидетельствующими о прямом эффекторном (антибиотическом) действии, была обнаружена способность многих АМП проявлять регуляторную (иммуномодулирующую) функцию и участвовать в функционировании не только врожденного, но и приобретенного иммунитета [3]. В связи с этим в литературе сосуществуют два термина: «антимикробные пептиды» («antimicrobial peptides») и «защитные пептиды» («host defense peptides»), последний из которых чаще применяют в отношении пептидов, координирующих работу иммунных процессов организма-хозяина.

Приобретенный иммунитет в процессе эволюции возник лишь с появлением челюстных рыб около 500 млн лет назад. Так как беспозвоночные организмы лишены приобретенного иммунитета, при контакте с патогенами они могут полагаться только на систему врожденного ответа. Стоит отметить, что к беспозво-

ночным относится подавляющее число (более 98%) видов животных на Земле, причем жизненный цикл некоторых представителей превышает 100 лет [4]. Учитывая «эволюционный успех» беспозвоночных, можно говорить о высокой эффективности сформировавшихся у них систем защиты. В многоклеточных организмах АМП могут распределяться системно, например, поступая в гемолимфу насекомых или экспрессируясь в иммунных клетках крови позвоночных, либо локализоваться в эпителиальных тканях, которые чаще других контактируют с патогенами (слизистые оболочки, кожа). Широкий спектр антибиотического действия АМП, в том числе в отношении резистентных штаммов патогенов, относительно малая вероятность селекции устойчивых к АМП возбудителей инфекционных заболеваний, быстрое и эффективное уничтожение клеток-мишеней позволяют рассматривать эти пептидные соединения как основу для разработки лекарственных средств нового поколения [5].

К настоящему времени выделено и охарактеризовано около 4000 природных АМП [6]. Основой для классификации АМП могут служить такие физико-химические и биологические характеристики, как источник происхождения, размер молекулы, первичная структура, тип биологической активности, механизм действия и т.д., однако наиболее удобным критерием оказалась пространственная структура пептидов. Впервые классификация на основе особенностей пространственной структуры АМП была предложена в 1995 году [7]. Большое значение в этой системе придается наличию дисульфидных связей в молекуле пептида и их числу. Наибольшее распространение получила классификация, в соответствии с которой все АМП подразделяются на три структурных класса. К первому относят пептиды, обладающие α -спиральной конформацией. Во второй класс объединяют линейные пептиды, не образующие α -спиралей и отличающиеся повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков (Gly, Pro, His, Trp). Третий класс составляют пептиды, в структуре которых наблюдаются антипараллельные β -тяжи. Среди АМП последнего класса встречаются молекулы со структурой β -складчатого листа, состоящего из трех тяжей (большинство дефенсинов позвоночных), двух тяжей, образующих β -шпильчатую структуру, или со смешанной структурой, включающей в себя как β -листы, так и α -спирали. Данный обзор сфокусирован на β -шпильчатых антимикробных пептидах животного происхождения, стабилизированных дисульфидными связями. На *рис. 1* представлены данные о мультифункциональных свойствах основных представителей семейства β -шпильчатых АМП, а также их первичные и пространственные структуры.

Молекулярный механизм антибиотического действия АМП в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны. Предложены три основные модели, описывающие механизмы нарушения барьерных функций клеточной мембраны в присутствии АМП. Согласно первой из них, названной моделью «бочки из клепок» («barrel-stave» model) [8], молекулы АМП, обладающие, как правило, суммарным положительным зарядом, гидрофобностью и амфифильностью, внедряются в мембрану и формируют олигомерные ионные каналы или поры, внутренняя поверхность которых образована гидрофильными аминокислотными остатками. Данная модель была предложена, в частности, для β -шпильчатого АМП тахиплезина из гемоцитов подковообразного краба [9]. Учитывая высокое содержание основных аминокислотных остатков в структуре большинства АМП, образующиеся каналы должны обладать положительно заряженной внутренней поверхностью и быть анион-селективными, что чаще всего не наблюдается. Однако каналы, формируемые β -шпильчатым АМП тахиплезином, действительно обладают выраженной селективностью по отношению к анионам. Вторая модель, основанная на описании формирования тороидальной поры («toroidal pore» model), применима в отношении более широкого круга АМП [10]. Главное отличие этой модели от предыдущей заключается в том, что внутренняя гидрофильная поверхность каналов включает не только катионные участки АМП, но и анионные головки фосфолипидов. Преимуществом этой модели является более высокая стабильность комплекса за счет электростатических взаимодействий АМП и липидов. Третья модель, названная ковровой («carpet» model), основана на детергентоподобном действии АМП при высоких концентрациях пептидов [11]. С повышением концентрации АМП мембрана постепенно утрачивает стабильность, в ней появляются тороидальные разрывы, образуются липид-пептидные мицеллы и, в конечном итоге, происходит лизис клетки. Границы применения описанных моделей носят условный характер, а конечный результат действия АМП по любому из приведенных механизмов – нарушение барьерной функции клеточной мембраны. Избирательность действия АМП объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микробов и клеток организма-хозяина [12].

Наряду с обширными данными о мембранотропных свойствах АМП появляется все больше сведений о внутриклеточных мишенях их действия. В частности, показано, что тахиплезин связывается с ДНК в области малой бороздки [13]. Связываясь

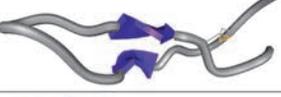
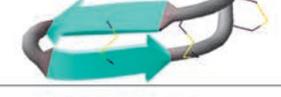
Название	Источник	Активность	Первичная структура	Пространственная структура	Ссылка
Тигеринин-1	<i>Rana tigerina</i> (кожный секрет лягушки)	Б, М	FCTMIPIPRCY*	-	[37]
Бактенецин	<i>Bos taurus</i> (нейтрофилы быка)	Б, В	RLCRIVVIRVCR	-	[34]
Танатин	<i>Podisus maculiventris</i> (гемолимфа клопа)	Б, Г	GSKKPVPPIIYCNRRTGKCQRM		[40, 42]
Ареницин-2	<i>Arenicola marina</i> (целомоциты пескожила)	Б, Г, Ц	RWCVYAYVRIRGVLVRYRRCW		[50, 54]
Лактоферрицин В	<i>Bos taurus taurus</i> (молоко коровы)	Б, Г, В, О, Л, И	FKCRRWQWRMKKLGAPSIITCVRRAF		[22, 23]
Тахиплезин-1	<i>Tachyplesus tridentatus</i> (гемоциты мечехвоста)	Б, Г, В, О, Ц, Л, И	KWCFRVCYRGICYRRCR*		[62, 63]
Гомезин	<i>Acanthoscurria gomesiana</i> (гемоциты паука)	Б, Г, П, О, Ц	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR*		[72, 73]
Андроктонин	<i>Androctonus australis</i> (гемолимфа скорпиона)	Б, Г, Т	RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY		[76, 77]
Протегрин-1	<i>Sus scrofa</i> (лейкоциты свиньи)	Б, Г, В, О, Ц	RGGRLCYCRRRFCVCVGR*		[79, 80]
θ-дефенсин-1	<i>Macaca mulatta</i> (лейкоциты макаки-резус)	Б, Г, В, Л, И	GFCRCLCRRGVCRICCTR		[89, 93]
Гепцидин	<i>Homo sapiens</i> (гепатоциты человека)	Б, М	DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT		[100, 101, 103]

Рис. 1. Строение и биологическая активность β-шпильчатых антимикробных пептидов. Дисульфидные связи отмечены тонкими линиями. Жирной линией обозначена пептидная связь, замыкающая в цикл структуру θ-дефенсина. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование, Z – N-концевая пироглутаминовая кислота. Обозначение биологических функций: Б – антибактериальная активность, Г – противогрибковая активность, В – противовирусная активность, П – антипаразитарная активность, О – противоопухолевая активность, Ц – цитотоксическая или гемолитическая активность, Л – способность связывать эндо- и экзотоксины, И – иммуномодулирующая активность, Т – нейротоксическая активность, М – регуляция метаболизма

с ДНК, АМП могут подавлять процессы репликации и транскрипции. Наряду с цитоплазматической мембраной и внутриклеточными мишенями некоторые АМП обладают сродством к компонентам клеточной

стенки бактерий и грибов. Высказывается предположение, что антибиотическое действие этих АМП реализуется путем ингибирования биосинтеза клеточной стенки. Многие АМП, обладающие противо-

грибковой активностью (в том числе тахиплезин), способны связываться с хитином [14].

Помимо инактивации микроорганизмов, в том числе бактерий, грибов, простейших, вирусов, АМП как молекулярные факторы системы врожденного иммунитета участвуют в регуляции иммунных реакций организма. В частности, АМП обладают опсонизирующей микробы активностью [15], проявляют хемотаксическую активность в отношении макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [16], вызывают дегрануляцию тучных клеток [17], модулируют дифференцировку дендритных клеток [18], участвуют в регуляции ангиогенеза [19], обладают кортикостатической активностью [20]. Конкретные примеры участия β -спилечных АМП в регуляции иммунных реакций приведены ниже.

Далее рассмотрены структурно-функциональные характеристики основных представителей семейства β -спилечных АМП, разбитого на четыре подгруппы в зависимости от числа дисульфидных связей.

1. β -СПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ОДНОЙ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗЬЮ

Лактоферрицины

Лактоферрицины представляют собой фрагменты N-концевого функционального домена лактоферрина, образующиеся путем ограниченного протеолиза пепсином в кислых условиях (рис. 2). Лактоферрин – мультифункциональный железосвязывающий гликопротеин, в настоящее время рассматриваемый в качестве одного из неотъемлемых элементов противинфекционной защитной системы человека и животных. Впервые на возможность участия лактоферрина в формировании устойчивости к инфекциям обратили внимание японские ученые [21]. Ими были выделены два пептида, представляющие собой фрагменты 1–54 и 17–41 N-концевого участка коровьего лактоферрина, обладающие значительно более выраженным антимикробным действием по сравнению с исходным белком. Фрагмент 17–41, впоследствии названный лактоферрицином В [22], представляет собой катионный пептид с одной дисульфидной связью, замыкающей 18-членный цикл между остатками Cys2 и Cys20 [23]. Представители семейства лактоферрицинов обладают рядом защитных свойств лактоферринов, выделенных из женского и коровьего молока, причем некоторые свойства проявляются значительно сильнее, чем у исходного белка. Лактоферрицины проявляют антибактериальную активность в отношении широкого диапазона микроорганизмов, действуя как по бактерицидному, так и по бактериостатическому механизму [24]. Противовирусное действие пептида лактофер-

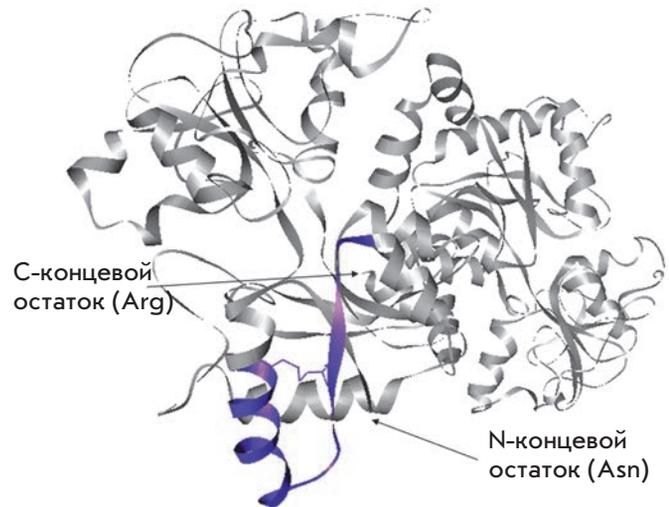


Рис. 2. Кристаллическая структура лактоферрина коровы *Bos taurus taurus*. Сиреневым цветом выделен фрагмент последовательности, соответствующий лактоферрицину В (аминокислотные остатки с 17 по 41)

рицин В выражено намного слабее, чем у нативного коровьего лактоферрина. Тем не менее он оказывает ингибирующий эффект на ряд вирусов [25]. Наряду с подавлением болезнетворных бактерий, лактоферрицин В обладает ингибирующей активностью в отношении некоторых возбудителей микозов, включая *Candida albicans* и ряд дерматофитов [26], а также проявляет *in vitro* противоопухолевую активность в отношении различных типов малигнизированных клеток, образующихся при лейкозах, фибросаркоме, раке и нейробластоме, в концентрациях, нетоксичных для фибробластов и эритроцитов [27]. Стоит отметить, что лактоферрицин В вызывает гибель опухолевых клеток как в результате некроза, так и апоптоза [28, 29]. В дополнение к этому пептид обладает иммуномодулирующей активностью, выступая в роли противовоспалительного агента [30]. Этот эффект объясняется способностью лактоферрицина В связывать метилированные CpG-содержащие олигонуклеотиды, выделяющиеся в окружающую среду при гибели или в процессе деления бактериальных клеток и активирующие воспалительные процессы в организме [31]. Лактоферрицин В способен также активно связывать бактериальные липополисахариды, тем самым ингибируя активность клеток иммунной системы [32]. К настоящему времени фрагмент hLF1–11 лактоферрина человека, обладающий противовоспалительной активностью, прошел первую стадию клинических испытаний в качестве иммуномодулятора [33].

Бактенецин

Бактенецин – небольшой антимикробный пептид, выделенный из нейтрофильных гранулоцитов крупного рогатого скота и состоящий из 12 аминокислотных остатков. Остатки цистеина в положениях 3 и 11 образуют дисульфидную связь, замыкающую 9-членный цикл [34]. Природный бактенецин обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении широкого спектра как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, при этом его гемолитическая активность находится на незначительном уровне [35]. На основе бактенецина получен ряд аналогов, обладающих повышенным терапевтическим индексом. Некоторые из этих пептидов обладают противовирусной активностью в отношении вируса герпеса [36].

Тигеринин-1

Тигеринин-1 – короткий пептид, состоящий из 12 аминокислотных остатков. Этот пептид, выделенный из кожи лягушки *Rana tigerina*, достаточно сильно отличается от других АМП земноводных. Цистеины в положениях 2 и 10 образуют дисульфидную связь, таким образом большая часть молекулы представляет из себя 9-членный цикл. Эта структурная особенность сближает тигеринин с бактенецином [37]. Сходство сохраняется также и в спектрах активности пептидов. Тигеринин обладает антимикробной активностью в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов [38]. Отдельно следует упомянуть один из аналогов тигеринина – тигеринин-1R, который способен стимулировать выработку инсулина. Показано, что пептид способен вызывать деполаризацию мембраны и увеличивать концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} в β -клетках поджелудочной железы, что приводит к стимуляции выброса инсулина. В ходе экспериментов, проведенных на мышах с сахарным диабетом второго типа, показано значительное ускорение расщепления глюкозы при введении мышам тигеринина-1R. При этом пептид не оказывает токсического воздействия на организм. Рассматривается возможность создания на основе тигеринина-1R препарата, эффективного при сахарном диабете второго типа [39].

Танатин

Среди множества АМП, выделенных из насекомых, танатин клопа-щитника *Podisus maculiventris* является единственным пептидом, молекула которого обладает конформацией β -спиральки. Зрелый танатин состоит из 21 аминокислотного остатка и несет значительный положительный заряд (+6) при физиологических значениях pH [40]. Данный пептид не имеет существенной гомологии с другими защитными

Танатин

Бревенин-1



Рис. 3. Сравнение первичной структуры танатина из клопа *P. maculiventris* и бревенина-1 из японской лягушки *R. brevipoda*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

пептидами насекомых, однако близок по первичной и вторичной структуре к АМП из кожных секретов лягушек рода *Rana* [41]. Степень гомологии между танатином и бревенином-1 из кожи японской лягушки *R. brevipoda* приближается к 50%, оба пептида содержат небольшой цикл в С-концевой части молекулы, замкнутый дисульфидной связью и включающий восемь (танатин) или семь (бревенины) аминокислотных остатков (рис. 3).

Характерный для бревенинов мотив, названный «Rana box», обнаружен у многих АМП амфибий – эскулентинов, гаегуринов, раналексининов. Во всех перечисленных молекулах цикл содержит положительно заряженные остатки, разделенные остатком треонина. У танатина данный участок образует жесткую β -спиральную структуру, в то время как N-концевой фрагмент сохраняет подвижность [42].

Обнаружено, что танатин продуцируется в жировом теле насекомого при экспериментальном инфицировании патогенными микроорганизмами. Пептид характеризуется широким спектром антибактериальной и противогрибковой активности, он способен подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей в концентрациях, в большинстве случаев не превышающих 10 мкМ. Кроме того, танатин не проявляет гемолитической активности даже в концентрациях, которые на порядок превышают МИК в отношении бактерий, что свидетельствует о высокой селективности действия. Танатин способен подавлять рост ряда бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе антибиотикоустойчивых штаммов *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. Природный танатин повышает эффективность ряда классических антибиотиков в отношении клинических изолятов, экспрессирующих эффлюксные насосы, обеспечивающие множественную лекарственную устойчивость [43]. В ходе структурно-функциональных исследований танатина был открыт ряд аналогов с улучшенными терапевтическими индексами [44]. Укороченный аналог танатина – R-танатин – способен эффективно

подавлять рост и образование биопленок у различных штаммов MRSA как *in vitro*, так и *in vivo* [45]. Наибольший интерес среди аналогов вызвал более активный S-танатин, в котором треонин в положении 15 был заменен на серин. Была показана высокая безопасность и эффективность данного аналога в отношении мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* как в условиях *in vitro*, так и в случае внутривенного введения в экспериментах на мышах [46, 47]. Способность танатина эффективно подавлять рост грибных патогенов была использована в области биотехнологии растений. Так, трансгенные культуры риса и арабидопсиса, содержащие ген танатина, показали высокую устойчивость к ряду фитопатогенов [48, 49].

Ареницины

Ареницины – катионные пептиды, выделенные из целомоцитов морского кольчатого червя *Arenicola marina* [50]. Молекулы ареницинов состоят из 21 аминокислотного остатка, шесть из которых положительно заряженные остатки аргинина, и стабилизируются одной дисульфидной связью, образующей 18-членный макроцикл (рис. 4). Природные ареницины проявляют высокую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, патогенных грибов и дрожжей даже в условиях высокой ионной силы [51]. Различными методами была показана способность ареницинов нарушать целостность бактериальных мембран. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о бактерицидном, а не о бактериостатическом механизме действия ареницинов. При изучении противогрибковой активности ареницина-1 была показана его роль в индукции апоптоза [52]. Вместе с тем, природные изоформы ареницина обладают и высокой гемолитической активностью. По результатам определения общей токсичности рекомбинантного ареницина в экспериментах *in vivo* этот пептид может быть отнесен к классу III токсичности ($20 > \text{LD}_{50} > 700$ мг/кг) для мышей CD-1 [53]. Пространственная структура



Рис. 4. Сравнение первичных структур изоформ ареницина из морского кольчатого червя *A. marina*. Желтым цветом выделены остатки цистеина – положительно заряженные основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

ареницина-2 в водных растворах представляет собой скрученную β-шпильку, стабилизированную девятью водородными и одной дисульфидной связью [54, 55]. В условиях мембранного окружения происходят конформационные изменения и димеризация пептида, что приводит к образованию олигомерных пор, формируемых с участием липидов [56–58]. Подобный механизм деполаризации мембраны с образованием «тороидальных пор» был описан ранее для β-шпилечного АМП протегрина [59].

2. β-ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ДВУМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

Ареницин-3

В 2005 году датской фармацевтической компанией Adenium Biotech был запатентован выделенный из морского кольчатого червя *A. marina* антимикробный пептид ареницин-3 [60], спектр биологической активности которого сходен со спектрами открытых нами ранее ареницина-1 и ареницина-2 [50] (рис. 4). Ареницин-3 значительно отличается по структуре от двух других представителей семейства: степень гомологии на уровне кодирующей нуклеотидной и аминокислотной последовательности белков-предшественников составляет всего 57 и 44% соответственно. Ареницин-3 состоит из 21 аминокислотного остатка, имеет суммарный положительный заряд +4 и проявляет активность в концентрациях менее 1 мкМ в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью. В отличие от ареницинов-1 и -2, данная молекула стабилизирована двумя дисульфидными связями и практически не вызывает лизис эритроцитов в концентрациях до 400 мкМ. Использование систем высокопроизводительного скрининга комбинаторных библиотек позволило создать широкий спектр его аналогов, структуры которых были запатентованы. Изучение антимикробного действия аналогов ареницина-3 в условиях *in vivo* выявило их высокий терапевтический потенциал, поскольку эффективные дозы были на порядок ниже максимально переносимых при исследованиях на моделях пневмонии и инфекции мочевыделительной системы у мышей. Один из аналогов ареницина-3 (NZ17074) в настоящее время проходит стадию доклинических исследований как препарат против инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями, обладающими множественной лекарственной устойчивостью [61].

Тахиплезины и полифемузины

Тахиплезины были выделены из гемоцитов подковообразного краба *Tachypleus tridentatus* [62]. Похожие

пептиды, названные полифемузуинами, были обнаружены у близкородственного вида *Limulus polyphemus* [63]. Наряду с другими антимикробными факторами тахиплезина и полифемузины депонируются в малых гранулах гемоцитов [64]. Тахиплезина и полифемузины состоят из 17–18 аминокислотных остатков, имеют суммарный положительный заряд +6 или +7 и стабилизированы двумя дисульфидными связями. Среди особенностей структуры стоит отметить наличие амидированного С-концевого остатка аргинина. Положительно заряженные и гидрофобные остатки при контакте с липидным бислоем придают молекуле тахиплезина выраженные амфифильные свойства [65]. Тахиплезина обладают выраженной активностью в отношении широкого спектра бактерий и дрожжей. Полифемузины имеют аналогичный спектр антимикробного действия, однако значения МИК, как правило, ниже, что позволяет считать представителей данного подсемейства, наряду с протегринами и асеницинами, наиболее активными АМП животного происхождения [66]. Более того, активность этих пептидов не ограничивается прямым мембранотропным действием. Помимо способности формировать стабильные поры и вызывать деполяризацию бактериальных мембран, тахиплезина может связываться с внутриклеточными мишенями, в частности с геномной и плазмидной ДНК [13]. Кроме того, тахиплезина способен связывать бактериальные эндотоксины, а также проявлять иммуномодулирующую функцию, участвуя в активации системы комплемента и регуляции пролиферации клеток, обеспечивающих реакции системы врожденного иммунитета [67]. Открытие противовирусной активности полифемузинов в отношении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и гриппа привело к разработке ряда терапевтически ценных аналогов с соответствующей направленностью действия [68]. Еще одна мишень тахиплезина и полифемузинов – опухолевые клетки. Несмотря на выраженную мембранотропную активность, в том числе в отношении эритроцитов, противоопухолевые свойства этих молекул связаны с процессами активации апоптоза [69], подавления пролиферации опухолевых клеток [70], а также активации классического каскада системы комплемента [71].

Гомезин

Гомезин – АМП, выделенный из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana* [72]. По структуре [73] он наиболее близок тахиплезинам и полифемузуинам. Гомология с этими АМП составляет около 50%. Гомезин содержит 18 аминокислотных остатков, включая четыре цистеина, образующих две дисульфидные связи, N-концевую пироглутамино-

вую кислоту и С-концевой амидированный аргинин. Аналогичные модификации N- и С-концевых остатков встречаются среди пептидных гормонов. Спектр антимикробной активности гомезина столь же широк, как и у его гомологов, и включает грамотрицательные и грамположительные бактерии, паразитические простейшие, а также дрожжевые и нитчатые грибы. Например, гомезин способен связываться с поверхностью мембраны и ингибировать рост дрожжеподобного гриба *Cryptococcus neoforma* [74]. Подобно тахиплезинам, гомезин обладает противоопухолевой активностью как *in vitro* в отношении злокачественных клеток молочной железы и толстой кишки и клеток меланомы, так и *in vivo* в экспериментах на мышах с привитой меланомой [75]. Стоит отметить, что гомезин обладает умеренной гемолитической активностью и токсичностью в отношении нормальных клеток.

Андроктонин

Андроктонин – 25-членный пептид из гемолимфы скорпиона *Androctonus australis*, содержащий четыре остатка цистеина, образующих две дисульфидные связи [76]. Синтез андроктонина в гемоцитах скорпиона протекает конститутивно. Молекула андроктонина имеет большой суммарный положительный заряд (+8) и содержит мотив RRRGG, обнаруженный также в дефенсинах скорпионов. Аминокислотные последовательности андроктонина, тахиплезина и полифемузинов характеризуются умеренной степенью гомологии, однако их пространственные структуры отличаются типом β-изгиба [77]. Кроме того, расположением остатков цистеина и положением дисульфидных связей этот пептид напоминает α-коноксин SII – блокатор n-ацетилхолиновых рецепторов из яда морского моллюска *Conus striatus* (рис. 5). Более того, сообщалось, что андроктонин имеет сравнимую с α-коноксином SII аффинность к никотиновому рецептору ската *Torpedo* [76] и, таким образом, может послужить основой для создания анальгетических препаратов.

Андроктонин
α-Коноксин SII



Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей андроктонина из скорпиона *A. australis* и α-коноксина SII из морского моллюска *C. striatus*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

Даже в высоких концентрациях – вплоть до 150 мкМ – андроктонин не вызывает лизис эритроцитов млекопитающих, что может объясняться его большей гидрофильностью и слабо выраженными амфифильными свойствами [78]. Однако, несмотря на низкое содержание (около 30%) гидрофобных остатков по сравнению с другими β-шпилечными АМП, андроктонин способен нарушать целостность бактериальных мембран. Андроктонин активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, нитчатых и дрожжевых грибов, в то время как его линейный аналог, не содержащий дисульфидных связей, сохраняет активность лишь в отношении грамположительных бактерий.

Протегрины

Семейство протегринов, впервые выделенных из нейтрофилов свиньи более 20 лет назад [79], включает четыре изоформы, состоящие из 16–18 аминокислотных остатков. Стабильность пространственной структуры протегринов обеспечивается двумя внутримолекулярными дисульфидными связями [80]. Протегрины относят к семейству кателицидинов – АМП, которые синтезируются как С-концевая часть белка-предшественника, содержащего консервативный кателиновый домен. Образование зрелых протегринов происходит во внеклеточном пространстве в ходе протеолитического процессинга эластазой [81]. Ранее упоминалось, что протегрины относятся к числу наиболее активных АМП. Минимальная ингибирующая концентрация протегрин-1 в отношении большинства бактериальных штаммов составляет менее 0.5 мкМ [82]. Для сравнения, MSI-78 – высокоактивный аналог одного из наиболее известных α-спиральных АМП магаинина, выделенного из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и действующего по схожему с протегринами мембранотропному механизму, проявляет активность в отношении широкого спектра штаммов бактерий в концентрациях ~ 2–4 мкМ и выше [83]. Помимо антибактериального действия, протегрин способен проявлять активность в отношении дрожжевых и опухолевых клеток [84, 85], а также вирусов [86]. Отдельного упоминания заслуживает один из аналогов протегрин-1 – синтетический 17-членный пептид исеганан (IB-367), отобранный в результате скрининга нескольких сотен аналогов с различными аминокислотными заменами и делециями [87]. Исеганан проявляет выраженную активность в отношении широкого спектра бактерий и грибов, порой превосходя по активности природные пептиды. Его бактерицидная активность сохраняется в растворе NaCl с концентрацией 150 мМ, соответствующей физиологической концентрации ионов Na⁺ в плазме крови человека. Исеганан рассматривается как перспективный пре-

парат для лечения пациентов с оральным мукозитом, подвергнутых противоопухолевой терапии, а также для терапии вентилятор-ассоциированной пневмонии, муковисцидозов и профилактики заболеваний различной этиологии, передающихся половым путем [88].

3. β-ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ТРЕМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

θ-дефенсины

Дефенсины позвоночных принято разделять на три подсемейства: α-, β- и θ-дефенсины. Всех их объединяют катионные свойства, присутствие β-структурных участков, а также наличие шести остатков цистеина, образующих три внутримолекулярные дисульфидные связи. Отличия заключаются в размерах, структуре и свойствах молекул, а также в положении дисульфидных связей. θ-Дефенсины были выделены из лейкоцитов низших узконосых обезьян – макака-резус и бабуина – и являются единственным примером ковалентно замкнутых циклических пептидов животного происхождения [89, 90]. У человека и других эволюционно более «поздних» приматов θ-дефенсины не обнаружены. Позднее было показано, что лейкоциты человека синтезируют мРНК, кодирующую белки-предшественники θ-дефенсинов, однако наличие стоп-кодона в его сигнальной последовательности препятствует их биосинтезу [91]. На основе данных о последовательности транскриптов были синтезированы θ-дефенсины человека, названные ретроциклинами [92]. θ-Дефенсины у обезьян образуются в результате сплайсинга по принципу «голова к хвосту» двух нонапептидов, являющихся частями двух независимых белков-предшественников (рис. 6). Таким образом,

Источник	Ген/Псевдоген	Нонапептид + 3 а.о.
<i>Homo sapiens</i> (человек)	DEFT-1 (ψ)	RCICGRGIC RLL
	DEFT-4 (ψ)	RCICGRRIC RLL
<i>Gorilla gorilla</i> (горилла)	DEFT-1 (ψ)	RCICGRGIC RLL
<i>Macaca mulatta</i> (макака-резус)	DEFT-1	RCLCRRGVC QLL
	DEFT-2	RCICTRGFC RLL
	DEFT-3	RCICVLGIC RLL
	DEFT-4	RCICTRGVC QLL
<i>Hylobates syndactylus</i> (сиаманг)	DEFT-1	RCICGRGVC RLL

Рис. 6. Сравнение продуктов экспрессии генов/псевдогенов DEFT из приматов [91]. Только первые девять аминокислотных остатков (нонапептид) участвуют в биосинтезе зрелого пептида. Оставшиеся три остатка продукта экспрессии гена удаляются в ходе процессинга. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки

зрелые θ -дефенсины состоят из 18 аминокислотных остатков и формируют β -шпильчатую структуру, стабилизированную тремя дисульфидными связями [93] (рис. 7). Стоит отметить, что благодаря независимому гомо- или гетеродимерному сплайсингу количество экспрессирующихся генов (*DEFT*) белков-предшественников определяет конечное число изоформ θ -дефенсина у конкретного биологического вида. Так, у бабуина *Paria anubis* экспрессия четырех генов *DEFT* теоретически приводит к образованию 10 изоформ, однако на уровне пептидов обнаружены лишь пять [94]. *DEFT* представляет собой мутировавший ген предшественника α -дефенсина со стоп-кодоном в области, кодирующей зрелый пептид.

Нарушая структурную целостность мембран, θ -дефенсины и ретроциклины проявляют высокую антибактериальную и противогрибковую активность при концентрациях около 1 мкМ. Однако, в отличие от ряда описанных выше АМП, при значительном повышении ионной силы среды активность снижается на порядок [90]. θ -Дефенсины обладают способностью связывать бактериальные экзотоксины, в частности летальный фактор сибиреязвенного токсина из *Bacillus anthracis* [95] и листериолизин О из *Listeria monocytogenes* [96]. Как и у андроктоина, пространственная структура θ -дефенсинов характеризуется невысокой амфифильностью, что довольно нетипично для β -шпильчатых АМП, и приводит к низкой гемолитической активности этих молекул. Благодаря низкой токсичности, а также обнаруженным у них свойствам лектинов, θ -дефенсины рассматриваются в качестве прототипов противовирусных средств. Во многих работах показана способность ретроциклинов препятствовать распространению вирусов иммунодефицита человека [92], гриппа [97] и герпеса [98]. Стоит отметить, что противовирусное действие θ -дефенсинов не связано ни с виротоксическими, ни с цитотоксическими эффектами в отношении зараженных клеток. Считается, что θ -дефенсины препятствуют распространению оболочечных вирусов благодаря связыванию с поверхностными гликопротеинами, ответственными за взаимодействие вируса с клеткой при ее заражении. Показана иммуномодулирующая активность θ -дефенсинов, которая проявляется в способности подавлять биосинтез провоспалительных цитокинов [99].

4. β -ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ЧЕТЫРЬМА ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

Гепцидины

Гепцидины представляют собой семейство β -шпильчатых АМП, стабилизированных четырь-

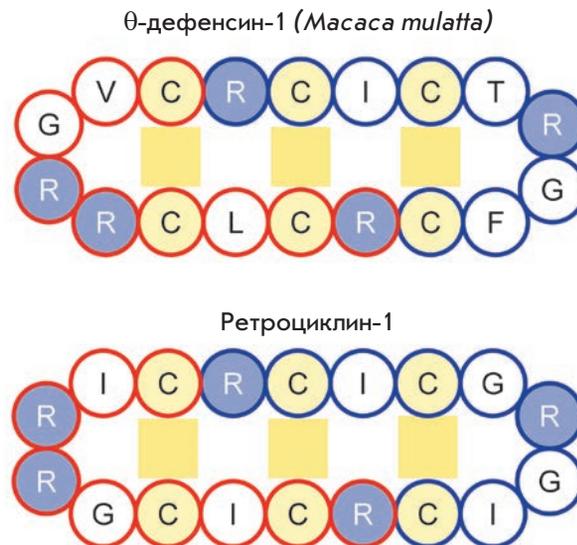


Рис. 7. Аминокислотные последовательности θ -дефенсина-1 из макака-резус *Macaca mulatta* и ретроциклина-1. Аминокислотные остатки, входящие в состав первого и второго нонапептидов, образующих циклическую структуру в результате сплайсинга, обведены красным и синим цветом соответственно. Желтым цветом выделены остатки цистеина и дисульфидные связи, голубым – основные аминокислотные остатки

мя дисульфидными связями. Гепцидины найдены у многих позвоночных на уровне транскрипта, однако в виде зрелого пептида они выделены лишь из жидкостей и тканей человека и рыб [100–102]. Гепцидин человека, который иногда называют экспрессирующимся в печени АМП-1 (LEAP-1 – liver-expressed AMP-1), был выделен из мочи, крови и печени. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гепцидины различных видов, достаточно консервативна, что в большей степени выражено у млекопитающих. Для гепцидинов характерен следующий порядок замыкания дисульфидных связей: Cys1–Cys8, Cys2–Cys7, Cys3–Cys6, Cys4–Cys5, причем три из них участвуют во взаимодействии β -тяжей, в то время как дисульфидный мостик Cys4–Cys5 приводит к характерной для данного семейства молекул деформации области β -поворота и формированию впадины, во внутренней части которой сосредоточены основные аминокислотные остатки, а во внешней – гидрофобные [103]. Благодаря такой амфифильной структуре гепцидины обладают широким спектром антимикробной активности, подавляя рост бактерий, нитчатых грибов и дрожжей. Стоит отметить, что у рыб зрелые гепцидины обнаруже-

ны и выделены из жабр, хотя ген преимущественно экспрессировался в гепатоцитах. Биосинтез гепцидина у рыб индуцируется при контакте с патогенными бактериями. Аналогичная ситуация наблюдалась и у человека: зрелые пептиды присутствовали в моче и плазме крови, в то время как мРНК синтезируется преимущественно в печени.

Показано, что антимикробный эффект гепцидина обусловлен не прямым воздействием на бактериальную мембрану [104], а способностью связываться с нуклеиновыми кислотами [105], а также лишением микроорганизмов доступного железа [106], необходимого для функционирования супероксиддисмутазы, т.е. защиты от активных форм кислорода. Именно поэтому, несмотря на свойства типичного АМП, его основной физиологической функцией в организме принято считать регуляцию метаболизма железа. Ряд экспериментов на нокаутных мышах позволил предположить, что гепцидин играет ключевую роль в поддержании гомеостаза железа [107]. Недостаток гепцидина в организме приводит к метаболическим нарушениям, при которых наблюдается «перенасыщение» железом. Избыток молекул гепцидина связывают с хронической почечной недостаточностью, анемией, воспалением и рядом других заболеваний [108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше данные показывают, что, несмотря на сравнительно небольшое число известных β -спилечных АМП, их биологические функции весьма многообразны. Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что β -спилечные АМП объединяет между собой ряд важных структурно-функциональных особенностей с точки зрения возможности создания новых антибиотиков на их основе, а именно: небольшой размер (до 25 аминокислотных остатков); суммарный положительный заряд и амфифильные свойства, достаточные для проявления мембранотропной активности по отношению к широкому спектру бактериальных мишеней; стабилизированная дисульфидными связями компактная структура, способствующая повышенной

протеолитической устойчивости. Ключевая роль дисульфидных связей как фактора, обуславливающего устойчивость β -спилечных АМП к биодegradации, показана в ряде работ на примере аналогов лактоферрицина, бактенецина, гомезина и θ -дефенсина [109–112]. Таким образом, все описанные в обзоре β -спилечные АМП объединяет не только сходство пространственной структуры, но и способность эффективно уничтожать бактериальные клетки-мишени. Их главным достоинством по сравнению с традиционными антибиотиками является то, что бактерии пока не способны выработать эффективные механизмы развития резистентности в отношении этих веществ, поскольку для этого потребуются внести серьезные изменения в структуру и электрофизиологические свойства клеточной мембраны [113].

Поиск и изучение структурно-функциональных особенностей β -спилечных АМП дают исключительно богатый исходный материал для создания лекарственных средств нового поколения. Ключевой задачей исследователей, работающих над созданием новых антибиотиков пептидной природы, в настоящее время является проблема токсичности и увеличение продолжительности жизни этих молекул в кровотоке. Благодаря своим структурно-функциональным особенностям β -спилечные АМП могут стать основой для создания антибиотиков системного и поверхностного применения, иммуномодуляторов, блокаторов экзо- и эндотоксинов, препаратов для лечения метаболических нарушений, противоопухолевых и противовирусных препаратов, анальгетиков. Альтернативным направлением является использование β -спилечных АМП в сельскохозяйственной биотехнологии, а именно для создания трансгенных линий растительных культур, конститутивно экспрессирующих гены АМП и вследствие этого обладающих повышенной устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам и другим стрессогенным факторам внешней среды. ●

Работа поддержана грантом РФ (соглашение № 14-14-01036).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. С.-Пб.: Наука, 2006. 261 с.
2. Zasloff M. // Nature. 2002. V. 415. № 6870. P. 389–395.
3. Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D. // Ann. Rheum. Dis. 2003. V. 62 (Suppl 2). P. ii17–ii21.
4. Bergquist D.C., Williams F.M., Fisher C.R. // Nature. 2000. V. 403. № 6769. P. 499–500.
5. Roscia G., Falciani C., Bracci L., Pini A. // Curr. Protein Pept. Sci. 2013. V. 14. № 8. P. 641–649.
6. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. // PLoS One. 2013. V. 8. № 6. P. e66557.
7. Boman H.G. // Annu. Rev. Immunol. 1995. V. 13. P. 61–92.
8. Baumann G., Mueller P.J. // Supramol. Struct. 1974. V. 2. № 5–6. P. 538–557.
9. Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. // Biochemistry. 1997. V. 36. № 32. P. 9799–9806.
10. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. // Biophys. J. 2001. V. 81. № 3. P. 1475–1485.

11. Shai Y. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 55–70.
12. Matsuzaki K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 1–10.
13. Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 11. P. 2998–3004.
14. Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S.J. // *Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 37. P. 26172–26178.
15. Fleischmann J., Selsted M., Lehrer R.I. // *Diagn. Microbiol. Dis.* 1985. V. 3. № 3. P. 233–242.
16. Biragyn A., Surenhu M., Yang D., Ruffini P.A., Haines B.A., Klyushnenkova E., Oppenheim J.J., Kwak L.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 11. P. 6644–6653.
17. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. № 4. P. 1066–1075.
18. Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., MacDonald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. // *Immunol.* 2004. V. 172. № 2. P. 1146–1156.
19. Li J., Post M., Volk R., Gao Y., Li M., Metais C., Sato K., Tsai J., Aird W., Rosenberg R., et al. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 1. P. 49–55.
20. Zhu Q.Z., Hu J., Mulay S., Esch F., Shimasaki S., Solomon S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 2. P. 592–596.
21. Saito T., Miyakawa H., Tamura Y.J. // *Dairy Sci.* 1991. V. 74. № 11. P. 3724–3730.
22. Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1992. V. 1121. № 1–2. P. 130–136.
23. Hwang P.M., Zhou N., Shan X., Arrowsmith C.H., Vogel H.J. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. № 12. P. 4288–4298.
24. Yamauchi K., Tomita M., Giehl T.J., Ellison R.T. // *Infect. Immun.* 1993. V. 61. № 2. P. 719–728.
25. Jenssen H., Andersen J.H., Uhlin-Hansen L., Gutteberg T.J., Rekdal O. // *Antiviral Res.* 2004. V. 61. № 2. P. 101–109.
26. Bellamy W., Yamauchi K., Wakabayashi H., Takase M., Takakura N., Shimamura S., Tomita M. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. V. 18. P. 230–233.
27. Yoo Y., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I. // *Jpn. J. Cancer Res.* 1997. V. 88. № 2. P. 184–190.
28. Eliassen L.T., Berge G., Leknessund A., Wikman M., Lindin I., Løkke C., Ponthan F., Johnsen J.I., Sveinbjørnsson B., Kogner P., et al. // *Int. J. Cancer.* 2006. V. 119. № 3. P. 493–500.
29. Mader J.S., Salsman J., Conrad D.M., Hoskin D.W. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 4. P. 612–624.
30. Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., Hanson L.A. // *Pediatr. Res.* 1996. V. 40. № 2. P. 257–262.
31. Britigan B.E., Lewis T.S., Waldshemid M., McCormick M.L., Krieg A.M. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 5. P. 2921–2928.
32. Ellison R., 3rd, Giehl T. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. № 8. P. 1080–1091.
33. Velden W.J., van Iersel T.M., Blijlevens N.M., Donnelly J.P. // *BMC Med.* 2009. V. 7. P. 44.
34. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 20. P. 9573–9575.
35. Wu M., Hancock R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 5. P. 1274–1276.
36. Shestakov A., Jenssen H., Hancock R.E., Nordström I., Eriksson K. // *Antiviral Res.* Nov. 2013. V. 100. № 2. P. 455–459.
37. Sai K.P., Jagannadham M.V., Vairamani M., Raju N.P., Devi A.S., Nagaraj R., Sitaram N. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 4. P. 2701–2707.
38. Sitaram N., Purna Sai K., Singh S., Sankaran K., Nagaraj R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 7. P. 2279–2283.
39. Ojo O., Abdel-Wahab Y., Flatt P., Mechkarska M., Conlon J. // *Diabetes Obes. Metab.* 2011. V. 13. № 12. P. 1114–1122.
40. Fehlbaum P., Bulet P., Chernysh S., Briand J.P., Roussel J.P., Letellier L., Hetru C., Hoffmann J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 3. P. 1221–1225.
41. Morikawa N., Hagiwara K., Nakajima T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. № 1. P. 184–190.
42. Mandard N., Sodano P., Labbe H., Bonmatin J.M., Bulet P., Hetru C., Ptak M., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 256. № 2. P. 404–410.
43. Pages J.M., Dimarq J.L., Quenin S., Hetru C. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003. V. 22. № 3. P. 265–269.
44. Lee M.K., Cha L., Lee S.H., Hahm K.S. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 35. № 3. P. 291–296.
45. Hou Z., Da F., Liu B., Xue X., Xu X., Zhou Y., Li M., Li Z., Ma X., Meng J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 10. P. 5045–5052.
46. Wu G., Deng X., Wu P., Shen Z., Xu H. // *Peptides.* 2012. V. 36. № 1. P. 109–113.
47. Wu G., Wu P., Xue X., Yan X., Liu S., Zhang C., Shen Z., Xi T. // *Peptides.* 2013. V. 45. P. 73–77.
48. Wu T., Tang D., Chen W., Huang H., Wang R., Chen Y. // *Gene.* 2013. V. 527. № 1. P. 235–242.
49. Imamura T., Yasuda M., Kusano H., Nakashita H., Ohno Y., Kamakura T., Taguchi S., Shimada H. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. № 3. P. 415–424.
50. Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. // *FEBS Lett.* 2004. V. 577. № 1–2. P. 209–214.
51. Andrä J., Jakovkin I., Grötzinger J., Hecht O., Krasnodembskaya A.D., Goldmann T., Gutschmann T., Leippe M. // *Biochem. J.* 2008. V. 410. № 1. P. 113–122.
52. Cho J., Lee D.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 12. P. 1246–1251.
53. Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Якименко З.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // *Токсикологический вестник.* 2012. T. 112. № 1. С. 40–43.
54. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 360. № 1. P. 156–162.
55. Stavroudis A., Tsoulos I.G., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. // *Biopolymers.* 2009. V. 92. № 3. P. 143–155.
56. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Nadezhdin K.D., Paramonov A.S., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // *Biopolymers.* 2008. V. 89. № 5. P. 455–464.
57. Salnikov E.S., Aisenbrey C., Balandin S.V., Zhmak M.N., Ovchinnikova T.V., Bechinger B. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 18. P. 3784–3795.
58. Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 28. P. 6255–6265.
59. Mani R., Cady S.D., Tang M., Waring A.J., Lehrer R.I., Hong M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 44. P. 16242–16247.
60. Hoegenhaug H.H.K., Mygind P.H., Kruse T., Segura D.R., Sandvang D., Neve S. // *WO Patent App.* 2011 PCT/EP2011/059,6896.
61. Fox J.L. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 5. P. 379–382.
62. Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 32. P. 16709–16713.
63. Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y. // *J. Biochem.* 1989. V. 106. № 4. P. 663–668.

64. Shigenaga T., Takayenoki Y., Kawasaki S., Seki N., Muta T., Toh Y., Ito A., Iwanaga S. // *J. Biochem.* 1993. V. 114. № 3. P. 307–316.
65. Oishi O., Yamashita S., Nishimoto E., Lee S., Sugihara G., Ohno M. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 14. P. 4352–4359.
66. Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E., Schneider G. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. V. 11. № 1. P. 37–51.
67. Ozaki A., Arika S., Kawabata S. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 15. P. 3863–3871.
68. Tamamura H., Kuroda M., Masuda M., Otaka A., Funakoshi S., Nakashima H., Yamamoto N., Waki M., Matsumoto A., Lancelin J.M., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1163. № 2. P. 209–216.
69. Chen Y., Xu X., Hong S., Chen J., Liu N., Underhill C.B., Creswell K., Zhang L. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 6. P. 2434–2438.
70. Shi S.L., Wang Y.Y., Liang Y., Li Q.F. // *World J. Gastroenterol.* 2006. V. 12. № 11. P. 1694–1698.
71. Chen J., Xu X.M., Underhill C.B., Yang S., Wang L., Chen Y., Hong S., Creswell K., Zhang L. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 11. P. 4614–4622.
72. Silva P. Jr., Daffre S., Bulet P. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 43. P. 33464–33470.
73. Mandard N., Bulet P., Caille A., Daffre S., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 4. P. 1190–1198.
74. Barbosa F.M., Daffre S., Maldonado R.A., Miranda A., Nimrichter L., Rodrigues M.L. // *FEMS Microbiol Lett.* 2007. V. 274. № 2. P. 279–286.
75. Rodrigues E.G., Dobroff A.S., Cavarsan C.F., Paschoalin T., Nimrichter L., Mortara R.A., Santos E.L., Fázio M.A., Miranda A., Daffre S., et al. // *Neoplasia.* 2008. V. 10. № 1. P. 61–68.
76. Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffmann J.A., van Dorsselaer A., Bulet P. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 47. P. 29537–29544.
77. Mandard N., Sy D., Maufrais C., Bonmatin J.M., Bulet P., Hetru C., Vovelle F. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1999. V. 17. № 2. P. 367–380.
78. Hetru C., Letellier L., Oren Z., Hoffmann J.A., Shai Y. // *Biochem J.* 2000. V. 345 (Pt 3). P. 653–664.
79. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // *FEBS Lett.* 1993. V. 327. № 2. P. 231–236.
80. Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. // *Chem. Biol.* 1996. V. 3. № 7. P. 543–550.
81. Panyutich A., Shi J., Boutz P.L., Zhao C., Ganz T. // *Infect. Immun.* 1997. V. 65. № 3. P. 978–985.
82. Steinberg D.A., Hurst M.A., Fujii C.A., Kung A.H., Ho J.F., Cheng F.C., Loury D.J., Fiddes J.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. V. 41. № 8. P. 1738–1742.
83. Ge Y.G., MacDonald D.L., Holroyd K.J., Thornsberry C., Wexler H., Zasloff M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 4. P. 782–788.
84. Shamova O.V., Sakuta G.A., Orlov D.S., Zenin V.V., Shtein G.I., Kolodkin N.I., Afonina I.V., Kokriakov V.N. // *Cell Tissue Biology.* 2007. V. 1. № 6. P. 524–533.
85. Paredes-Gamero E.J., Martins M.N., Cappabianco F.A., Ide J.S., Miranda A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1820. № 7. P. 1062–1072.
86. Rothan H.A., Abdulrahman A.Y., Sasikumer P.G., Othman S., Rahman N.A., Yusof R. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2012. P. ID 251482.
87. Chen J., Falla T.J., Liu H., Hurst M.A., Fujii C.A., Mosca D.A., Embree J.R., Loury D.J., Radcliff P.A., Cheng Chang C., et al. // *Biopolymers.* 2000. V. 55. № 1. P. 88–98.
88. Giles F.J., Redman R., Yazji S., Bellm L. // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2002. V. 11. № 8. P. 1161–1170.
89. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E. // *Science.* 1999. V. 286. № 5439. P. 498–502.
90. Lehrer R.I., Cole A.M., Selsted M.E. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 32. P. 27014–27019.
91. Nguyen T.X., Cole A.M., Lehrer R.I. // *Peptides.* 2003. V. 24. № 11. P. 1647–1654.
92. Cole A.M., Hong T., Boo L.M., Nguyen T., Zhao C., Bristol G., Zack J.A., Waring A.J., Yang O.O., Lehrer R.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 4. P. 1813–1818.
93. Trabi M., Schirra H.J., Craik D.J. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 14. P. 4211–4221.
94. Garcia A.E., Osapay G., Tran P.A., Yuan J., Selsted M.E. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 12. P. 5883–5891.
95. Wang W., Mulakala C., Ward S.C., Jung G., Luong H., Pham D., Waring A.J., Kaznessis Y., Lu W., Bradley K.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32755–32764.
96. Arnett E., Lehrer R.I., Pratikhya P., Lu W., Seveau S. // *Cell Microbiol.* 2011. V. 13. № 4. P. 635–651.
97. Doss M., White M.R., Teclé T., Gantz D., Crouch E.C., Jung G., Ruchala P., Waring A.J., Lehrer R.I., Hartshorn K.L. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 12. P. 7878–7887.
98. Yasin B., Wang W., Pang M., Cheshenko N., Hong T., Waring A.J., Herold B.C., Wagar E.A., Lehrer R.I. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 10. P. 5147–5156.
99. Schaal J.B., Tran D., Tran P., Osapay G., Trinh K., Roberts K.D., Brasky K.M., Tongaonkar P., Ouellette A.J., Selsted M.E. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. e51337.
100. Krause A., Neitz S., Mägert H.J., Schulz A., Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Adermann K. // *FEBS Lett.* 2000. V. 480. № 2–3. P. 147–150.
101. Park C.H., Valore E.V., Waring A.J., Ganz T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 11. P. 7806–7810.
102. Shike H., Lauth X., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., van Olst J.C., Shimizu C., Bulet P., Burns J.C. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 8. P. 2232–2237.
103. Hunter H.N., Fulton D.B., Ganz T., Vogel H.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 40. P. 37597–37603.
104. Hocquellet A., Odaert B., Cabanne C., Noubhani A., Dieryck W., Joucla G., Le Senechal C., Milenkov M., Chaignepain S., Schmitter J.M. // *Peptides.* 2010. V. 31. № 1. P. 58–66.
105. Hocquellet A., Le Senechal C., Garbay B. // *Peptides.* 2012. V. 36. № 2. P. 303–307.
106. Ganz T. // *Blood.* 2003. V. 102. № 3. P. 783–788.
107. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 15. P. 8780–8785.
108. Ganz T., Nemeth E. // *Annu. Rev. Med.* 2011. V. 62. P. 347–360.
109. Nguyen L.T., Chau J.K., Perry N.A., de Boer L., Zaat S.A.J., Vogel H.J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9. P. e12684.
110. Nan Y., Jacob B., Kim Y., Shin S. // *J. Pept. Sci.* 2012. V. 18. № 12. P. 740–747.
111. Fazio M.A., Oliveira V.X., Bulet P., Miranda M.T.M., Daffre S., Miranda A. // *Biopolymers.* 2006. V. 84. № 2. P. 205–218.
112. Conibear A.C., Rosengren K.J., Daly N.L., Henriques S.T., Craik D.J. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 188. № 15. P. 10830–10840.
113. Peschel A., Sahl H.G. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. № 7. P. 529–536.

УДК 612.74,577.29

Регуляция экспрессии изоформ PGC-1 α в скелетных мышцах

Д. В. Попов^{1,2*}, Е. А. Лысенко¹, И. В. Кузьмин^{1,3}, О. Л. Виноградова^{1,2}, А. И. Григорьев^{1,2}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76а

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 27б, стр. 10

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: danil-popov@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.11.2014

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены функциональная роль и регуляция экспрессии различных изоформ белка-коактиватора PGC-1 α , одного из ключевых регуляторов биогенеза митохондрий в скелетной мышце. Паттерн экспрессии мРНК *PGC-1 α* может значительно изменяться в покое и после мышечной активности. Это связано с тем, что экспрессия гена *PGC-1 α* с канонического и альтернативного промоторов регулируется различными физиологическими стимулами, которые воздействуют на разные сигнальные пути. Экспрессия с канонического (проксимального) промотора регулируется главным образом через АМР-активируемую протеинкиназу, а с альтернативного – через β 2-адренорецепторы. Транскрибируемые с обоих промоторов мРНК подвергаются альтернативному сплайсингу с образованием укороченных изоформ PGC-1 α , которые обладают значительно большей устойчивостью к деградации и регулируют преимущественно ангиогенез, тогда как полноразмерные изоформы – биогенез митохондрий. Существование нескольких изоформ частично объясняет широкий спектр функций этого белка и повышает способность организма адаптироваться к различным физиологическим стимулам. Регуляция экспрессии гена *PGC-1 α* с помощью различных сигнальных путей позволяет рассчитывать на разработку фармакологических способов воздействия на экспрессию этого гена. Это может иметь важное значение для лечения и профилактики различных заболеваний, таких, как метаболический синдром и сахарный диабет. Изучение механизмов, регулирующих экспрессию гена *PGC-1 α* , и их функциональной роли может позволить управлять экспрессией этого гена с помощью физических нагрузок и/или фармакологических воздействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА альтернативный сплайсинг, альтернативный промотор, скелетная мышца, PGC-1 α , экспрессия гена.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозил-5'-монофосфат; АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа; ATF – активирующий фактор транскрипции; СаМК – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа; CREB – сАМР-чувствительный фактор транскрипции; ERR – рецептор, родственник рецептору эстрогена; HDAC – деацетилаза гистонов класса IIa; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; MEF – стимулирующий фактор миоцитов; p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; PGC – коактиватор PPAR γ ; PKA – протеинкиназа A; PPAR – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом; UCP – разобщающий белок; VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов A; $\dot{V}O_{2max}$ – максимальная скорость потребления кислорода.

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы составляют более 30% веса взрослого человека. Высокий уровень метаболической активности позволяет рассматривать скелетные мышцы как секреторный орган, активно влияющий на работу других органов [1]. Во время мышечной работы в скелетных мышцах многократно увеличивается кровоток, потребление кислорода и раз-

личных субстратов: глюкозы, жирных кислот и др. Одновременно в работающем мышечном волокне происходит выраженное накопление ионов кальция и различных метаболитов, может наблюдаться снижение энергетического заряда клетки и окислительно-восстановительного потенциала. В ответ на регуляторные аэробные физические нагрузки в скелетных мышцах развиваются значительные адаптационные

изменения: увеличивается уровень капилляризации, объемная плотность митохондрий и активность окислительных ферментов, повышается максимальная скорость потребления кислорода и способность выполнять длительную работу. По современным представлениям эти адаптационные изменения тесно связаны с функцией коактиваторов семейства PGC-1 (коактиваторы ядерного рецептора γ , активируемого пролифераторами пероксисом (PPARG)). Это семейство состоит из белков PGC-1 α , PGC-1 β и родственного PGC коактиватора. Одному из этих белков – PGC-1 α – принадлежит наиболее значимая роль в регуляции биогенеза митохондрий в скелетной мышце.

Важно отметить, что известно несколько изоформ PGC-1 α [2, 3]. По-видимому, этим можно частично объяснить столь широкий спектр функциональных свойств PGC-1 α . Именно поэтому в последнее десятилетие изучению функций PGC-1 α , механизмов активации этого белка и особенностей регуляции экспрессии его гена посвящено большое количество исследований. В скелетной мышце представлено несколько изоформ PGC-1 α , обладающих разными функциональными свойствами. В настоящем обзоре рассмотрена роль PGC-1 α и особенности регуляции экспрессии различных его изоформ, прежде всего в скелетных мышцах, как в покое, так и во время восстановления после физических нагрузок.

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ ИЗОФОРМЫ PGC-1 α

Функциональная роль PGC-1 α

Во время и сразу после однократной аэробной нагрузки в скелетной мышце активируется ряд сигнальных киназ, таких, как АМР-зависимая протеинкиназа (АМРК), кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа (СаМК) и митоген-активируемая протеинкиназа р38 МАРК [4], а также NAD-зависимая деацетилаза [5]. В результате этого увеличивается экспрессия гена PGC-1 α (PPARGC1A) (см. ниже), а также происходит увеличение фосфорилирования и снижение ацетилирования (т.е. активация) уже имеющегося в клетке белка PGC-1 α (рис. 1). В скелетных мышцах грызунов [6, 7] и человека [8, 9] активированный PGC-1 α переносится в ядро, где коактивирует целый ряд факторов транскрипции. По-видимому, вызванная физическими упражнениями активация PGC-1 α может происходить и без увеличения его содержания в ядре. Так, в скелетных мышцах человека однократные аэробные нагрузки повышают содержание в ядре АМРК α 2 [10] и фосфорилированной р38 МАРК [11]. Предполагается, что это может способствовать активации уже находящегося в ядре PGC-1 α .

Активированный PGC-1 α может участвовать в активации транскрипции своего собственного гена по механизму положительной обратной связи [12], а также в активации целого ряда факторов транскрипции, таких, как ядерный респираторный фактор (NRF)-1 и -2, эстроген-связанный рецептор (ERR) α , рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (PPAR) α и γ . Активация этих белков инициирует экспрессию целого ряда генов, кодирующих белки, которые регулируют окислительные реакции и углеводно-жировой обмен [13–15]. С другой стороны, NRF-1 и NRF-2 увеличивают экспрессию генов митохондриальных факторов транскрипции А (TFAM), В1 (TFB1M) и В2 (TFB2M). Эти факторы, в основном TFAM и TFB2M, поступают в митохондрии и инициируют экспрессию генов, кодируемых митохондриальной ДНК [16]. Помимо этого, показано, что PGC-1 α может проникать в митохондрии, где образует комплекс с TFAM [7, 17, 18]. Предполагается, что это способствует инициации экспрессии митохондриальной ДНК (рис. 1). PGC-1 α также может индуцировать экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия А (VEGFA) независимо от индуцируемого гипоксией фактора (HIF) 1 α [19, 20]. Результаты последних работ показывают, что в скелетной мышце ангиогенез может регулироваться через PGC-1 α -зависимую активацию макрофагов [21].

Таким образом, можно заключить, что аэробные физические нагрузки вызывают в скелетной мышце выраженное увеличение экспрессии гена PGC-1 α , активацию уже существующего в клетке белка PGC-1 α и изменение его внутриклеточной локализации. PGC-1 α оказывает комплексное влияние на экспрессию целого ряда ядерных и митохондриальных генов, действуя как один из основных регуляторов биогенеза митохондрий, углеводно-жирового обмена, а также ангиогенеза в скелетной мышце (рис. 1).

Регуляция экспрессии гена PGC-1 α с канонического промотора

Более 10 лет назад Puigserver и соавт. впервые клонировали ген PGC-1 α мыши [22]. Затем был охарактеризован ген PGC-1 α человека, состоящий из 13 экзонов и кодирующий белок из 798 аминокислотных остатков с расчетной массой около 91 кДа. В промоторной области этого гена найдены два основных сайта инициации транскрипции, расположенные на 90 и 119 п.н. выше инициаторного кодона АТГ [23]. В дальнейшем регуляция экспрессии с этого промотора (канонического, или проксимального) была изучена достаточно подробно (рис. 1).

Канонический промотор гена PGC-1 α содержит два консервативных участка связывания с фактором транскрипции MEF2 (стимулирующий фак-

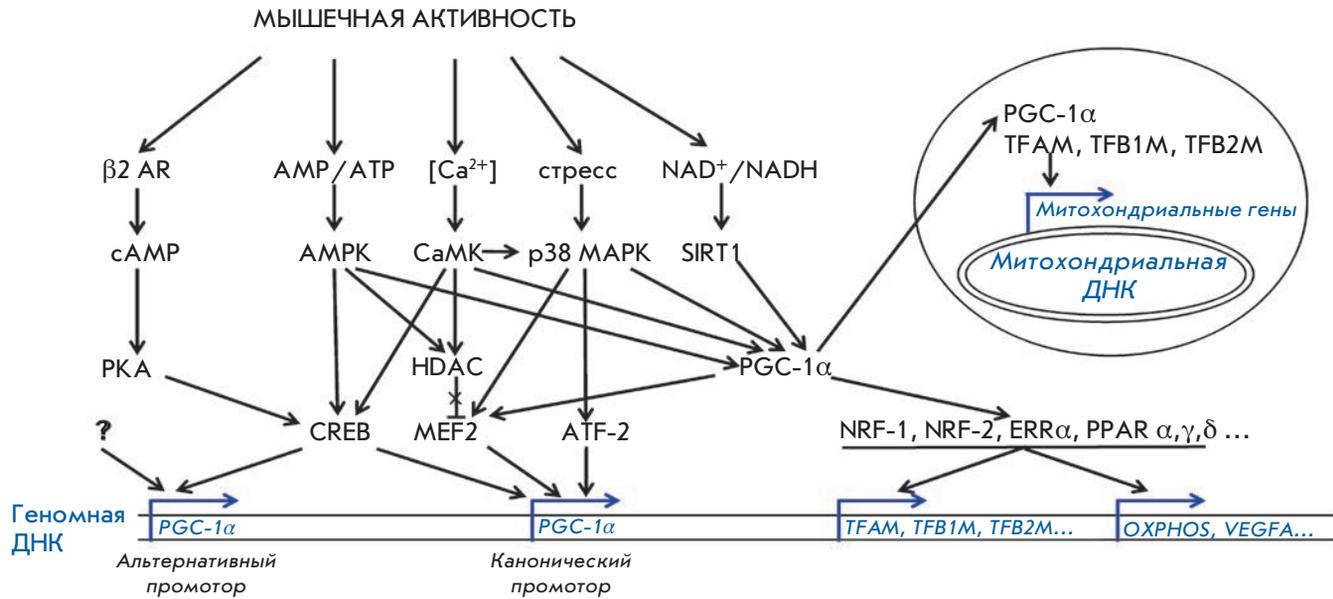


Рис. 1. Модель активации PGC-1α и регуляции экспрессии его гена с канонического и проксимального промотора. AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа, ATF – активирующий транскрипционный фактор, CaMK – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа, CREB – сAMP-чувствительный транскрипционный фактор, ERR – рецептор, родственник рецептору эстрогена, HDAC – деацетилаза гистонов класса IIa, MEF – стимулирующий фактор миоцитов, NRF – ядерный респираторный фактор, OXPHOS – гены, кодирующие белки, участвующие в реакциях окисления и фосфорилирования, p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38, PGC – коактиватор PPAR-гамма, PKA – протеинкиназа A, PPAR – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом, SIRT1 – NAD-зависимая деацетилаза sirtuin-1, TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор A, TFB1M – митохондриальный транскрипционный фактор B1, TFB2M – митохондриальный транскрипционный фактор B2, VEGFA – эндотелиальный фактор роста сосудов A, $\beta 2$ AR – $\beta 2$ -адренорецептор

тор миоцитов 2) и CRE-участок связывания с CREB (сAMP-чувствительный фактор транскрипции) [23]. Результаты опытов на культуре клеток и на мышцах [12, 24], а также на скелетных мышцах мышей *in vivo* [25] подтвердили, что факторы MEF2 и CREB важны для активации транскрипции гена *PGC-1α*.

Активированный белок PGC-1α может коактивировать MEF2, увеличивая тем самым экспрессию своего гена [11, 12]. Однократная велоэргометрическая нагрузка повышает содержание фосфорилированной p38 MAPK^{Thr180/Tyr182} в ядрах скелетной мышцы человека, а также его комплекса с MEF2 [11], что, по-видимому, активирует MEF2. Активность MEF2 ингибируется гистондеацетилазами класса IIa (HDAC) [26] и связана, главным образом, с HDAC5 [25]. Аэробные упражнения увеличивают содержание фосфорилированного HDAC5, что приводит к разрушению комплекса MEF2–HDAC5 и экспорту HDAC5 из ядра [11, 27]. Вызванное упражнениями фосфорилирование HDAC регулируется киназами САМКII и АМПК [27], реагирующими на изменение внутримышечного содержания АМР и ионов кальция [28, 29], а активация САМКII и АМПК положительно

связана с интенсивностью аэробных упражнений [4, 30–34].

Семейство факторов транскрипции CRE включает CREB и активирующий транскрипцию фактор (ATF)-2. Фосфорилирование CREB^{Ser133} и его последующая активация регулируются многими сигнальными киназами, в том числе САМКII и АМПК [35, 36]. Вызванная однократной нагрузкой активация САМКII и АМПК увеличивает уровень фосфорилирования фактора CREB^{Ser133}, влияя тем самым на экспрессию с канонического промотора гена *PGC-1α* [4, 37], причем уровень фосфорилирования CREB^{Ser133} в позднем периоде восстановления зависит от интенсивности нагрузки [4].

Индукцируемая стрессом киназа p38 MAPK повышает экспрессию гена *PGC-1α*, фосфорилируя ATF-2^{Thr71} и активируя его [37–39]. На вызванную нагрузкой активацию p38 MAPK влияет множество факторов, включая кальций и активные формы кислорода [37, 39]. Аэробные упражнения независимо от их интенсивности повышают уровень фосфорилирования p38 MAPK^{Thr180/Tyr182} [4]. Более того, активация p38 MAPK^{Thr180/Tyr182} может определяться систем-

ными факторами: уровень фосфорилирования р38 MAPK^{Thr180/Tyr182} возрастает после аэробных упражнений даже в неактивных мышцах [40]. Тем не менее уровень фосфорилирования ATF-2^{Thr71} зависит от интенсивности аэробной нагрузки. Это может косвенно свидетельствовать о том, что вызванное нагрузкой фосфорилирование ATF-2^{Thr71} регулируется другими сигнальными путями [4].

Активация различных сигнальных киназ и их мишеней, HDAC, MEK2, ATF-2 и CREB, под действием упражнений усиливает транскрипционную активность промотора *PGC-1 α* . При этом экспрессия гена *PGC-1 α* линейно зависит от интенсивности аэробной нагрузки в диапазоне от умеренной до максимальной [4, 41–43].

Регуляция экспрессии изоформ *PGC-1 α* с альтернативного промотора

Несколько лет назад две группы исследователей практически одновременно обнаружили в гене *PGC-1 α* альтернативный промотор, активный в скелетной мышце человека, расположенный на 14 т.п.н. выше канонического (проксимального) промотора (рис. 2А) [2, 44]. В последующем в нервной ткани человека был описан еще один тканеспецифический альтернативный промотор, расположенный на 587 т.п.н. выше канонического, транскрипция с которого приводит к образованию нескольких изоформ *PGC-1 α* [45]. Этот промотор не обладал выраженной активностью в скелетной мышце. Следует заметить, что тканеспецифические изоформы *PGC-1 α* найдены в печени (L-*PGC-1 α*) [46]. Ниже будут рассмотрены особенности регуляции синтеза изоформ *PGC-1 α* , главным образом, в скелетной мышце.

Влияние активации β -адренорецепторов на экспрессию гена *PGC-1 α* изучали с использованием β 2-агониста кленбутерола, и обнаружили выраженное увеличение экспрессии в скелетных мышцах мышей, тогда как у животных с нокаутом β 1-, β 2- и β 3-адренорецепторов подобный эффект отсутствовал. Показано, что β 2-блокаторы пропранолол и ICI 118551 снижают увеличение экспрессии гена *PGC-1 α* в скелетных мышцах после 45-минутной беговой нагрузки (15 м/мин) [47]. Эти результаты позволили предположить, что экспрессия *PGC-1 α* , по крайней мере частично, регулируется через активацию β -адренорецепторов. Одновременно обнаружили, что в скелетной мышце экспрессируются различные изоформы мРНК *PGC-1 α* [2].

Установлено [2, 20, 44], что с альтернативного промотора, расположенного примерно на 14 т.п.н. выше канонического, с которого транскрибируется первый экзон (1а) в канонической изоформе, экспрессируются новые транскрипты. В результате альтерна-

тивного сплайсинга продуктов, транскрибируемых с альтернативного промотора, образуются два варианта первого экзона: 1b и 1c. Эти транскрипты были названы *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c*, а каноническая изоформа обозначена как *PGC-1 α -a*. Начиная со второго экзона, нуклеотидная последовательность всех трех изоформ была одинаковой. Аминокислотная последовательность, кодируемая первым экзоном, у изоформ *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* отличалась и была короче, чем у канонического варианта на 4 и 13 аминокислотных остатков соответственно (рис. 2А). В покое в скелетных мышцах мышей [2, 20, 48] и человека [49–51] содержание мРНК изоформ, экспрессирующихся с альтернативного промотора, много меньше, чем транскрибируемых с канонического промотора. Однако опубликованы также данные, согласно которым в скелетных мышцах мыши в покое мРНК *PGC-1 α -a*, *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* экспрессируются на сопоставимом уровне [52].

Новые изоформы оказались функционально активными. Для измерения активности изоформ культуру клеток НЕК 293 трансфицировали плазмидами, экспрессирующими различные рецепторы PPAR (α , δ и γ) и изоформы *PGC-1 α* . Оказалось, что белки *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* активируют рецепторы так же, как *PGC-1 α -a* [2]. Физиологическая значимость экспрессии с альтернативного промотора подтверждена в опытах на трансгенных мышцах. Сверхэкспрессия *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* в скелетных мышцах трансгенных мышей привела к увеличению экспрессии генов, регулирующих биогенез митохондрий и жировой обмен [2]. В скелетных мышцах мышей, сверхэкспрессирующих *PGC-1 α -b*, наблюдали также выраженное увеличение экспрессии генов-мишеней *PGC-1 α* : цитохромоксидазы (*COX*) 2 и 4, генов-регуляторов жирового обмена (*CD36*, *MCAD*, *CPT1* и др.), гена фактора роста сосудистого эндотелия (*VEGF*) A, а также увеличение активности цитратсинтазы (*CS*) – маркера митохондриальной плотности в ткани, и увеличение капиллярной плотности. Во время бега с возрастающей скоростью на бегущей дорожке трансгенные животные проявили большую работоспособность, большую максимальную скорость потребления кислорода ($\dot{V}O_{2max}$), у них менее заметно выросло содержание лактата в крови. При этом доля окисляемых жиров у них была больше, чем у животных дикого типа [53].

Удалось выявить функциональные особенности разных изоформ *PGC-1 α* . Так произвольный бег в беговом колесе [20] и бег умеренной интенсивности (15 м/мин, 45 мин) на бегущей дорожке [2] привели к выраженному увеличению экспрессии в скелетных мышцах мышей мРНК *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c*, экспрессия мРНК *PGC-1 α -a* при этом не возросла.

Увеличение скорости бега до 20 и 30 м/мин привело к росту экспрессии мРНК *PGC-1 α -b* в 20 и 33 раза соответственно [48]. Любопытно, что увеличение нагрузки лишь несколько увеличило (в 1.4 и 1.8 раза соответственно) содержание мРНК *PGC-1 α -a*, транскрибируемой с канонического промотора. При этом после нагрузки уровень мРНК *PGC-1 α -b* стал выше, чем *PGC-1 α -a*. Сходным было соотношение между мРНК *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -a* в мышцах людей после аэробной нагрузки умеренной интенсивности длительностью 45–90 мин [49, 50]. В других тканях с высоким уровнем метаболической активности, как и в мышцах, наблюдались различия в экспрессии изоформ *PGC-1 α* при воздействии различных физиологических стимулов. Например, в печени мышей после 21-часового голодания выражено возрастала экспрессия только мРНК *PGC-1 α -a*. В буром жире мышей, выдержанных в течение нескольких часов при 4°C, увеличилась экспрессия только мРНК *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* [2, 54].

Приведенные результаты позволили предположить, что в скелетных мышцах экспрессия с альтернативного промотора гена *PGC-1 α* регулируется через активацию β 2-адренорецепторов [2, 20]. Это предположение было подтверждено в опытах с кленбутеролом, инъекции которого на несколько порядков увеличивали содержание в скелетных мышцах мышей мРНК *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c* (*PGC-1 α -2* и *PGC-1 α -3* в [20]), содержание мРНК *PGC-1 α -a* (*PGC-1 α -1* в [20]) при этом не менялось. Напротив, пропранолол и селективный ингибитор β 2-адренорецепторов ICI 118551 подавляли вызванное аэробной нагрузкой увеличение транскрипции мРНК изоформ *PGC-1 α* с альтернативного промотора. С другой стороны, фармакологическая активация АМПК должна была привести к специфическому увеличению экспрессии *PGC-1 α -a* с канонического промотора. АМПК активировали с помощью 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозил-5'-монофосфата (AICAR) [48]. Однако инъекция AICAR стимулировала в скелетных мышцах экспрессию гена *PGC-1 α* не только с канонического (примерно на 50%), но и с альтернативного (примерно на порядок) промоторов. По-видимому, это было связано с увеличением содержания адреналина (примерно на порядок) и норадреналина (примерно на 30%) в крови и стимуляцией мышечных β 2-адренорецепторов под действием AICAR. С целью исключения системного влияния изолированную мышцу крысы инкубировали в AICAR, что вызвало увеличение экспрессии мРНК *PGC-1 α -a* (примерно на 50%) без изменения содержания мРНК *PGC-1 α -b*. Это хорошо согласуется с более ранними результатами,

согласно которым AICAR не усиливает экспрессию с альтернативного промотора гена *PGC-1 α* в миобластах C2C12 [44]. Напротив, форсколин – активатор аденилатциклазы, стимулирует экспрессию только с альтернативного промотора. Кроме того, добавление ионофора кальция и сверхэкспрессия главных участников кальциевой сигнализации – CaMKIV и фосфатазы кальциейрина А, а также киназы p38 MAPK (МКК6) – приводит к увеличению экспрессии гена *PGC-1 α* с альтернативного промотора. Трансфекция миобластов плазмидами, содержащими фрагмент альтернативного промотора (дикого типа либо мутантный), показала, что активация альтернативного промотора зависит от связывания CREB с CRE-участком. Сходные результаты получены при трансфекции *m. tibialis anterior* у мышей [20]. Как уже говорилось, CRE-связывающий сайт содержится не только в альтернативном промоторе, но и в каноническом. На сегодняшний день не ясно, почему фосфорилирование CREB при активации β 2-адренорецепторов приводит к увеличению экспрессии преимущественно с альтернативного промотора [48]. Канонический промотор *PGC-1 α* содержит характерную для CRE-сайта палиндромную последовательность TGACGTCA, тогда как в альтернативном промоторе CRE-сайт не является полностью палиндромным из-за замены одного нуклеотида. Такой вариант CRE-участка способен связываться с CREB и необходим для транскрипции с альтернативного промотора. При этом сродство CREB к CRE-участку, содержащему замену, ниже, чем к палиндромной последовательности CRE-сайта в каноническом промоторе [44, 48].

Можно предположить, что в покое для обеспечения высокого (почти максимального) уровня экспрессии с канонического промотора гена *PGC-1 α* достаточно небольшой концентрации фосфорилированного CREB; при значительном повышении концентрации этого белка транскрипция с канонического промотора несколько возрастает. Для существенного увеличения экспрессии с альтернативного промотора необходимо высокое содержание фосфорилированного CREB. Следовательно, альтернативный промотор может оказаться намного чувствительнее к изменению концентрации фосфорилированного CREB, что объясняет различия в регуляции транскрипции с двух промоторов в покое и после мышечной активности. Не исключена возможность регуляции транскрипции с альтернативного промотора другими факторами транскрипции, родственными CREB. Также показано, что специфические мышечные факторы MyoD и MRF4 могут трансаktivировать альтернативный промотор, взаимодействуя с проксимальным мотивом E-box [44].

Таким образом, на основании экспериментов, проведенных на мышцах грызунов, предложена модель регуляции экспрессии изоформ PGC-1 α в скелетных мышцах при аэробных упражнениях [20, 48]. Низкоинтенсивные аэробные нагрузки не вызывают активации AMPK, но стимулируют симпатическую нервную систему. Это приводит к активации β 2-адренорецепторов и протеинкиназы A, увеличению содержания cAMP и фосфорилирования CREB^{Ser133} (рис. 1). Возможность регуляции экспрессии гена PGC-1 α без участия AMPK хорошо согласуется с тем, что при аэробных упражнениях умеренной интенсивности в мышцах людей не увеличивается уровень фосфорилирования AMPK^{Thr172} и экспрессии с канонического промотора, но при этом существенно возрастает экспрессия с альтернативного промотора [49, 50].

При интенсивности аэробных упражнений более 50–60% от $\dot{V}O_{2max}$ в скелетных мышцах активируется AMPK [30, 31] и одновременно продолжает расти активность симпатической нервной системы. Последнее приводит к усилению активности β 2-адренорецепторов и дополнительной стимуляции экспрессии с альтернативного промотора гена PGC-1 α . С другой стороны, активация AMPK приводит к инициации экспрессии с канонического промотора, что, по-видимому, происходит только при достаточно интенсивных аэробных физических нагрузках, вызывающих в мышцах выраженные метаболические изменения.

Необходимо отметить, что до сих пор не сформировано однозначное мнение о системе регуляции экспрессии гена PGC-1 α в скелетных мышцах. Некоторые работы ставят под сомнение описанную выше модель. Определение уровня мРНК и белка PGC-1 α в тканях крысы через 6 и 18 ч после инъекций кленбутерола или норадреналина [55] выявило заметное повышение этих показателей в бурой жировой ткани, но не в скелетных мышцах. Кленбутерол вызвал увеличение фосфорилирования CREB^{Ser133} в мышце, однако активность промотора гена PGC-1 α при этом не изменилась. Эти данные рассматриваются как аргумент против описанной модели. Отсутствие увеличения экспрессии мРНК PGC-1 α в мышце обусловлено, по-видимому, использованием праймеров для экзона 1a (прямой) и 2 (обратный), которые определяли экспрессию только с канонического промотора. Используемая для определения люциферазной активности плазида содержала, очевидно, фрагмент канонического промотора PGC-1 α , что объясняет отсутствие повышения активности этого промотора в ответ на кленбутерол. Однако эти рассуждения не объясняют отсутствий в изменении уровня белка PGC-1 α в скелетной мышце, поскольку

использовали антитела, которые должны были выявлять белковые продукты транскрипции с обоих промоторов.

Изучение эффектов AICAR и норадреналина на миобласты, выращенные из биоптатов скелетной мышцы человека, показало [49], что норадреналин вызывает увеличение экспрессии только мРНК PGC-1 α -b, что полностью согласуется с представленной выше моделью. Однако AICAR усиливает экспрессию не только с канонического промотора (мРНК PGC-1 α -a), но и с альтернативного (мРНК PGC-1 α -b), причем совместное использование AICAR и норадреналина оказывало аддитивный эффект на экспрессию с альтернативного промотора. Сделан вывод, что AMPK является наиболее важным регулятором гена PGC-1 α и может регулировать экспрессию с обоих промоторов. Возможность AMPK регулировать экспрессию гена PGC-1 α с обеих промоторов недавно была показана в скелетных мышцах мышей [62]. Помимо этого, стоит упомянуть о возможности активации р38 MAPK с помощью адреналина [56], что теоретически способно влиять на регуляцию экспрессии гена PGC-1 α с канонического промотора.

Таким образом, физические нагрузки различной интенсивности могут усиливать экспрессию PGC-1 α с разных промоторов. В упомянутых выше работах подразумевалось, что экспрессируются полноразмерные изоформы, содержащие 13 экзонов. Впоследствии было показано, что в результате альтернативного сплайсинга могут образоваться мРНК, содержащие стоп-кодон после экзона 6, которые кодируют укороченные варианты белка PGC-1 α . В большинстве рассмотренных работ использовали прямой праймер к одному из вариантов первого экзона (1a, 1b и 1c) и обратный – ко второму экзону, общему для всех изоформ, а на иммуноблоте оценивали изменение содержания только белка с мол. массой более 90 кДа, что соответствует полноразмерному белку. По-видимому, часть транскриптов PGC-1 α в описанных работах кодировала полноразмерный белок, а часть – укороченный. Ниже будет показано, что эти два белка действительно имеют различные характеристики и функции, что вполне ожидаемо, поскольку в укороченном белке отсутствуют многие активные сайты, представленные в полноразмерном белке.

Не ясно, все ли мРНК PGC-1 α могут транслироваться *in vivo* и есть ли различия в функциях продуктов трансляции. Получаемые изоформы белков должны отличаться лишь несколькими первыми аминокислотными остатками. Маловероятно, что эти отличия могут сильно повлиять на функциональные свойства полноразмерных или укороченных изоформ. Часто N-концевой фрагмент белка содер-

жит сигнальные последовательности, отвечающие за транспорт внутри клетки. По нашим неопубликованным данным изоформы PGC-1 α не содержат типичных сигналов, регулирующих транспорт в ядро или в митохондрии. Отсутствие известных сигналов не исключает особенностей внутриклеточного распределения разных изоформ PGC-1 α , но, по-видимому, эти различия несущественны. Важно отметить, что наличие разных промоторов свидетельствует о том, что экспрессия гена *PGC-1 α* может регулироваться различными сигнальными путями, которые активируются разными физиологическими стимулами.

Укороченные изоформы PGC-1 α

Исследуя адаптационный ответ скелетных мышц крыс на аэробные упражнения, Ваар и соавт. [57] обнаружили на иммуноблоте помимо полноразмерного белка PGC-1 α полосу, соответствующую белку ~34 кДа, что интерпретировали как присутствие укороченной изоформы PGC-1 α . Впоследствии Zhang и соавт. [37] выявили в бурой жировой ткани мышцей укороченную (N-truncated) NT-изоформу PGC-1 α , которая образуется в результате альтернативного сплайсинга между экзонами 6 и 7 и содержит короткую вставку – экзон 7а с преждевременным стоп-кодоном (рис. 2В). Белок NT-PGC-1 α детектируется на иммуноблоте в области 35–38 кДа, а в базе данных NCBI представлены мРНК человека (AB061325) и мыши (AB061324) [3], кодирующие белки из 271 и 270 аминокислотных остатков соответственно. Изоформа *NT-PGC-1 α* теоретически может транскрибироваться как с проксимального (1а), так и с альтернативного (1b и 1с) промоторов [54], чем, по-видимому, объясняется присутствие нескольких полос на иммуноблоте в области 35–38 кДа [3]. Изоформы белка NT-PGC-1 α обнаружены в головном мозге мышцей, почках и сердечной мышце человека. При этом содержание мРНК и белка укороченных изоформ и полноразмерного PGC-1 α было сопоставимым [3]. Позднее было показано, что в скелетных мышцах человека также экспрессируется мРНК NT-изоформ [52], составляющая значительную часть мРНК *PGC-1 α* [50, 51].

NT-изоформы сохранили два необходимых домена PGC-1 α : N-концевой, который рекрутирует SRC-1 и CREB-связывающий белок, и два LXXLL-подобных мотива, обеспечивающих взаимодействие с ядерными рецепторами. Сохранились некоторые сайты, фосфорилируемые p38 MAPK, PKA и AMPK. В то же время в NT-изоформах отсутствует C-концевой фрагмент, содержащий последовательность, регулирующую транспорт в ядро, лиганд-независимый PPAR γ -связывающий регион,

SR-богатый и RRM-домены, а также FOXO1, MEFC2 и TRAP220, C-концевой домен, регулирующий стабильность белка, и множество сайтов, участвующих в посттрансляционной модификации и регуляции белка (сайты фосфорилирования GSK-3 β , AMPK, Akt, p38 MAPK, PKA, метилирования аргинина и ацетилирования лизина) [3, 58, 59]. Столь выраженные отличия от полноразмерных изоформ определяют уникальные свойства NT-изоформ.

Внутриклеточная локализация и стабильность

Молекулярные механизмы, регулирующие стабильность белка PGC-1 α и его внутриклеточную локализацию, изучали еще до открытия NT-изоформ [60]. С этой целью в культуре кардиомиоцитов и в клетках COS-7 экспрессировали мутантные белки PGC-1 α , у которых отсутствовали различные C-концевые фрагменты. Оказалось, что полноразмерный PGC-1 α (аминокислотные остатки 1–797) – это короткоживущий белок, локализованный преимущественно в ядре, тогда как укороченный белок (1–565) находится как в ядре, так и в цитоплазме, а мутантный белок, состоящий из 292 аминокислотных остатков, – преимущественно в цитоплазме. Удаление C-концевого фрагмента привело к выраженному увеличению стабильности белка PGC-1 α . По-видимому, это связано со снижением уровня его убиквитинирования [60, 61]. Результаты этих экспериментов хорошо соотносятся со свойствами открытых впоследствии NT-изоформ PGC-1 α . Отсутствие C-концевого фрагмента делает NT-изоформы более устойчивыми к деградации по сравнению с полноразмерными PGC-1 α [3, 58].

На клеточной линии CHO-K1 [3, 58], а позже на мышечных волокнах мыши [59] с помощью конфокальной микроскопии было показано, что NT-изоформы, в отличие от полноразмерных изоформ PGC-1 α , локализованы преимущественно в цитоплазме (~90%). С помощью трансфекции различных NT-изоформ в клетки CHO-K1 установлено, что цитоплазматическая локализация характерна для всех укороченных изоформ, синтезируемых как с канонического (NT-PGC-1 α -а), так и с альтернативного промотора (NT-PGC-1 α -b и NT-PGC-1 α -c) [54]. Это свидетельствует о том, что локализация изоформ PGC-1 α зависит прежде всего от C-концевого фрагмента, а не от N-концевой последовательности.

Локализация NT-изоформ в клетке регулируется различными белками. На мышечных волокнах [59] и на клетках CHO-K1 [58] показано, что лептомицин Б – специфический ингибитор экспорта 1 – белка, регулирующего ядерный экспорт, вызывает увеличение содержания NT-PGC-1 α в ядре. По-видимому, низкое содержание NT-PGC-1 α в ядре связано

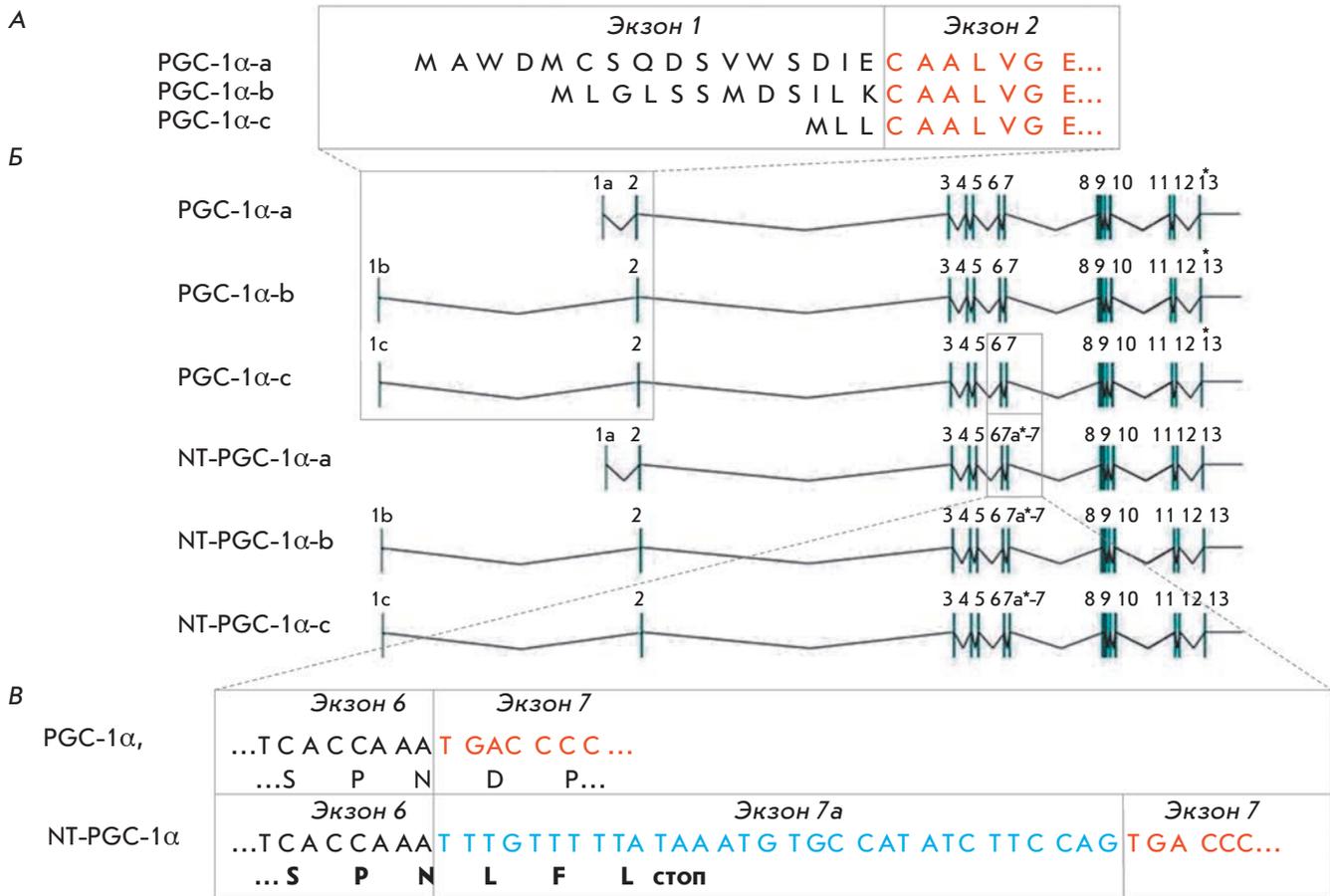


Рис. 2. А – различные изоформы PGC-1α мышцы экспрессируются с канонического (PGC-1α-a) и альтернативного промотора (PGC-1α-b и PGC-1α-c) и кодируют разные аминокислотные последовательности в первом экзоне. Б – расположение экзонов (вертикальные линии) у различных изоформ PGC-1α на геномной ДНК. Звездочкой обозначен стоп-кодон. В – нуклеотидная и аминокислотная последовательности между 6 и 7 экзонами полноразмерных (PGC-1α) и укороченных (NT-PGC-1α) изоформ

с тем, что скорость экспорта 1-зависимого экспорта из ядра превышает скорость диффузии в ядро [58]. Не исключена также возможность экспорта 1-независимого ядерного экспорта [59]. Активация опосредованной сАМР сигнализации увеличивает представленность NT-PGC-1α в ядерной фракции как мышечных волокон [59], так и клеток бурого жира [3]. Это предположительно связано с тем, что фосфорилирование NT-PGC-1α в положении 194, 241 и 256 с помощью РКА снижает экспорт 1-зависимый ядерный экспорт [58]. С другой стороны, по-видимому, существует р38 MAPK-зависимый механизм регуляции внутриклеточной локализации NT-PGC-1α. В клетках бурой жировой ткани увеличение содержания NT-PGC-1α в ядре, вызванное введением аналога сАМР (8-СРТ-сАМР), снижается при ингибировании р38 MAPK [3]. Однако следует

отметить, что ингибирование р38 MAPK приводило лишь к небольшому снижению прироста ядерной фракции NT-PGC-1α, тогда как ингибирование РКА полностью подавляло этот прирост. Это свидетельствует о ведущей роли β-адренорецепции в регуляции внутриклеточной локализации NT-PGC-1α и согласуется с данными, согласно которым в культуре мышечных волокон ни АICAR-зависимая активация AMPK, ни вызванная электрической стимуляцией активация р38 MAPK не вызывают увеличения содержания NT-PGC-1α в ядре [59].

Регуляция экспрессии мРНК NT-изоформ

NT-изоформы образуются в результате трансляции мРНК PGC-1α, содержащей вставку со стоп-кодоном в рамке считывания, между экзонами 6 и 7. Экспрессия NT-изоформ может динамично регу-

лироваться под влиянием различных физиологических факторов. Например, аэробная физическая нагрузка приводит к сопоставимому увеличению экспрессии полноразмерных и NT-изоформ мРНК *PGC-1 α* в мышцах мышей [62] и человека [50, 51]. При этом NT-изоформы могут экспрессироваться как с канонического, так и с альтернативного промотора [51, 62], а уровень их экспрессии, как и у полноразмерных изоформ, зависит от интенсивности нагрузки [62].

Можно предположить, что увеличение экспрессии как укороченных, так и полноразмерных изоформ мРНК *PGC-1 α* связано с активацией AMPK и β -адренорецепции, а регуляторные механизмы, описанные для полноразмерных изоформ, справедливы для NT-изоформ. Действительно, в стимулированных AICAR мышечных миотубах возрастают уровни мРНК укороченных и полноразмерных изоформ *PGC-1 α* [51]. Инъекции как AICAR, так и кленбутерола вызывают сопоставимое относительное увеличение экспрессии полноразмерных и укороченных изоформ в мышцах мыши [62]. С другой стороны, холодовая экспозиция (5 ч, 4°C) приводит к увеличению экспрессии мРНК *NT-PGC-1 α* и полноразмерной *PGC-1 α* (на ~15%) и их белков в буром жире мыши [3]. При этом при нормальной температуре (22°C) экспрессия происходит преимущественно с канонического промотора (мРНК *NT-PGC-1 α -a* и *PGC-1 α -a*). Холодовая экспозиция увеличивает преимущественно экспрессию с альтернативного промотора (мРНК *NT-PGC-1 α -b*, *NT-PGC-1 α -c*, *PGC-1 α -b* и *PGC-1 α -c*), что связано с активацией β -адренорецепции [3, 54].

Недавно Thom и соавт. [63] показали, что сплайсинг мРНК *PGC-1 α* между экзонами 6 и 7 может инициироваться гипоксией. Так, в культуре миоцитов скелетной мышцы, а также в миоцитах с подавленной активностью HIF-1 и -2 гипоксия (0.5% O₂, 16 ч) вызывала увеличение экспрессии только NT-изоформ. Это означает, что гипоксия индуцирует сплайсинг мРНК *PGC-1 α* независимо от сигнальных путей HIF.

Таким образом, регуляция экспрессии гена *PGC-1 α* с разных промоторов и регуляция сплайсинга – это независимые процессы. В заключение следует отметить, что до сих пор не ясно, все ли NT-изоформы могут транслироваться *in vivo* и существуют ли функциональные различия между этими изоформами.

Функциональная роль NT-изоформ

С помощью различных экспериментальных подходов *in vitro* было убедительно показано, что белок NT-*PGC-1 α* обладает функциональной активностью, т.е. способен коактивировать различные ядерные рецепторы: PPAR α и PPAR γ в CHO-K1-клетках

[3] и PPAR α , PPAR γ и ERR α в клетках COS-1 [54]. Гиперэкспрессия NT-*PGC-1 α* в клетках бурой жировой ткани (так же как и полноразмерных изоформ) увеличивает экспрессию мРНК *UCP1* и *CPT-1 β* , а также соотношение митохондриальной и ядерной ДНК, которое считается маркером активации биогенеза митохондрий [3].

Важно отметить, что функционально NT-изоформы *PGC-1 α* значительно отличаются от полноразмерных изоформ. Экспрессия генов-мишеней *PGC-1 α* и NT-*PGC-1 α* может различаться. При сверхэкспрессии полноразмерного *PGC-1 α -a* (*PGC-1 α -1* согласно [52]) в миотубах изменяется экспрессия 2002 генов, а тогда как NT-*PGC-1 α -b* (*PGC-1 α -4*, согласно [52]) влияет только на 519 генов. Причем одновременно эти изоформы влияют на экспрессию только 98 генов [52]. В адипоцитах бурой жировой ткани, экспрессирующих *PGC-1 α* или NT-*PGC-1 α* , наблюдается повышение экспрессии генов *Cox7al* и PPAR α , однако увеличение экспрессии *CPT-1 β* , *UCP1*, ERR α и *Cox8b* зависело только от NT-*PGC-1 α* , а *CytC* – только от полноразмерного *PGC-1 α* [58, 64].

Недавно появились данные, свидетельствующие о том, что в клетках скелетной мышцы NT-изоформы *PGC-1 α* активируют преимущественно ангиогенез, тогда как полноразмерные изоформы влияют на биогенез митохондрий и ангиогенез [63]. Миотубы, полученные из миобластов *PGC-1 α -/-* мыши, инфицировали аденовирусом, кодирующим NT-*PGC-1 α -a* или *PGC-1 α -a*. Это привело к сопоставимому повышению уровня мРНК этих изоформ. При этом уровень экспрессии генов-мишеней белка *PGC-1 α* и их белковых продуктов был разным. В миотубах, экспрессирующих NT-*PGC-1 α -a*, уровень мРНК генов-мишеней не изменился, а содержание митохондриальных белков, входящих в состав комплексов III и V, несколько повысилось, тогда как в клетках, экспрессирующих *PGC-1 α -a*, эти показатели существенно выросли. Сходная картина обнаружена для скорости потребления кислорода клетками: увеличение этого показателя было найдено только после увеличения экспрессии *PGC-1 α -a*. Напротив, NT-*PGC-1 α -a* вызывал большее, чем *PGC-1 α -a*, увеличение экспрессии гена *VEGFA* и активацию ангиогенеза. Эти результаты проверили в условиях *in vivo* с использованием трансгенных мышей со сверхэкспрессией одной из изоформ NT-*PGC-1 α -b* (*PGC-1 α 4* в [63]) в скелетных мышцах. Экспрессия генов-регуляторов ангиогенеза (*VEGFA*, *CD31*, *ANGPT2*) у трансгенных животных была повышена по сравнению с контролем, они имели большую капиллярную плотность в *m. tibialis anterior*. Преимущественная активация ангиогенеза

NT-изоформами объясняется сохранностью в них мотива LXXLL, с помощью которого осуществляется взаимодействие с $ERR\alpha$ – одним из регуляторов экспрессии *VEGFA* [20, 63].

Получить животных с нокаутом NT-PGC-1 α достаточно сложно, что не позволяет оценить влияние этой изоформы на фенотип и функции мышечной системы и целого организма. Тем не менее получены мыши [54, 65], у которых не экспрессируются полноразмерные изоформы PGC-1 α , но синтезируется мутантный вариант, состоящий из первых 254 аминокислотных остатков. Этот белок всего лишь на несколько остатков короче нативного NT-PGC-1 α и является его функциональным эквивалентом [54]. Показано [65], что у таких животных с нокаутом полноразмерной изоформы масса *m. soleus* – мышцы, состоящей преимущественно из волокон первого типа с высокими окислительными возможностями, была несколько меньше, чем у мышей дикого типа, а масса преимущественно гликолитической *m. tibialis anterior* осталась без изменений. Гистологический анализ не выявил заметных изменений в клетках скелетных мышц. Тем не менее в *m. soleus* (но не в *m. tibialis anterior*) объемная плотность митохондрий, базальная экспрессия генов-регуляторов биогенеза митохондрий, максимальная скорость стимулированного АДФ дыхания митохондрий, а также время бега до отказа в тесте с возрастающей нагрузкой на бегущей дорожке и $\dot{V}O_{2max}$ организмом у животных с нокаутом полноразмерной изоформы были значительно меньше, чем у животных дикого типа [65]. Любопытно, что у взрослых опытных животных экспозиция при 4°C вызывала снижение температуры тела, сопоставимое с контролем. По-видимому, это было связано с сохраненной способностью увеличивать экспрессию гена *UCP1* в буром жире [54, 65, 66], регулируемой, возможно, по Twist-1-зависимому механизму. Показано, что фактор транскрипции Twist-1 – негативный регулятор полноразмерного PGC-1 α , не влияет на активацию NT-PGC-1 α [64].

Интересно сравнить результаты изучения мышей с нокаутом полноразмерного PGC-1 α и мышей, у которых отсутствует активность белка PGC-1 α (изменена нуклеотидная последовательность мРНК PGC-1 α после экзона 2) во всем организме [67, 68] или только в скелетных мышцах [69, 70]. Размеры мышечных волокон, их состав и объемная плотность митохондрий у мышей с инактивированным PGC-1 α остались такими же, как у животных дикого типа. Подобные результаты можно частично объяснить гиперактивностью, возникающей из-за выраженных нарушений в головном мозге этих мышей [67, 68]. С другой стороны, в скелетных мышцах животных с нокаутом была снижена доля окислительных во-

локон типа I как в преимущественно окислительных, так и в преимущественно гликолитических мышцах [69, 70]. При этом у всех опытных животных базальная экспрессия генов-регуляторов биогенеза митохондрий была значительно ниже, чем у животных дикого типа как в смешанной (*m. quadriceps femoris*), так и в гликолитической (*m. gastrocnemius*) мышцах [67–70]. В отличие от мутантов, экспрессирующих укороченный PGC-1 α , у животных с полным отсутствием активности белка PGC-1 α снижалась температура тела при экспозиции на холоде [68], что можно объяснить подавлением экспрессии гена *UCP1*, регулируемой PGC-1 α , в буром жире. Таким образом, сопоставляя результаты различных исследований, можно сделать вывод о существовании функциональных отличий между укороченными и полноразмерными изоформами PGC-1 α .

До сих пор мы рассматривали влияние аэробных нагрузок на экспрессию изоформ PGC-1 α . В большинстве работ использовали именно аэробные нагрузки, активирующие биогенез митохондрий и ангиогенез в скелетной мышце, поэтому взаимосвязь между PGC-1 α и эффектами этих нагрузок представляется вполне логичной. Однако недавно Ruas и соавт. [52] показали, что одна из укороченных изоформ, NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4 согласно [52]), может регулировать миогенез. В миотубах, сверхэкспрессирующих NT-PGC-1 α -b, содержание мРНК *IGF-1* и миогенных факторов Myf-5 и -6 было больше, а мРНК миостатина меньше, чем в контрольных клетках или клетках, сверхэкспрессирующих полноразмерный PGC-1 α -a. В то же время увеличение экспрессии генов-регуляторов биогенеза митохондрий в этих миотубах было значительно менее выражено, чем в миотубах со сверхэкспрессией полноразмерного PGC-1 α -a. Обнаружено, что NT-изоформа белка PGC-1 α , как и его полноразмерный вариант, локализуется преимущественно в ядре, что не согласуется с полученными ранее результатами [58, 59]. Введение в скелетную мышцу мыши аденовирусного и плазмидного векторов, несущих NT-PGC-1 α -b, привело к выраженному увеличению площади поперечного сечения мышечных волокон, а также массы мышц по сравнению с контролем. Любопытно отметить, что в случае электропорации скелетной мышцы плазидами, кодирующими NT-PGC-1 α -a, которая экспрессируется с канонического промотора, укороченный белок не был получен (несмотря на увеличение содержания мРНК). Сделан вывод, что N-концевая последовательность NT-PGC-1 α -b обеспечивает накопление этого белка в клетке, тогда как NT-PGC-1 α -a такой особенностью не обладает [52]. Этот вывод не согласуется с результатами работы, согласно которой в миоту-

бах, инфицированных аденовирусом, кодирующим *NT-PGC-1 α -a*, повышено содержание укороченной изоформы белка [63]. Физиологические эффекты *NT-PGC-1 α -b* изучали с использованием трансгенных мышцей, сверхэкспрессирующих эту изоформу. У трансгенных животных наблюдалось небольшое увеличение экспрессии мРНК *VEGFA*, *EER α* и миоглобина, снижение экспрессии миостатина и отсутствие изменений в экспрессии мРНК *IGF* и генов, регулирующих биогенез митохондрий, по сравнению с контролем [52, 63]. При этом площадь поперечного сечения мышечных волокон, масса мышц, мышечная сила и время бега до отказа в тесте на бегущей дороге были несколько больше, чем у контрольных животных [52]. В этой работе не изучали влияние однократной нагрузки на изменение экспрессии мРНК *NT-PGC-1 α -b*, но было показано, что базальный уровень экспрессии этого транскрипта в скелетных мышцах людей увеличивается после 8 недель силовых тренировок и не изменяется после 8 недель аэробных тренировок [52]. Следует отметить, что в этом исследовании для детекции *NT-PGC-1 α -b* использовали праймеры, комплементарные экзонам 5 и 7a, которые могут выявлять не только *NT-PGC-1 α -b*, но и *NT-PGC-1 α -a*. Недавно показали, что однократные силовые упражнения, так же как и аэробные, увеличивают экспрессию обеих этих изоформ в скелетных мышцах человека [51], поэтому нет уверенности, что длительная силовая тренировка в исследовании Ruas и соавт. [52] привела к увеличению базальной экспрессии *NT-PGC-1 α -b*, а не *NT-PGC-1 α -a*.

Влияние изоформ *PGC-1 α* на гипертрофию скелетных мышц оценивали на модели с удалением мышц-синергистов [71]. В гипертрофированных мышцах отмечено увеличение абсолютного уровня фосфорилирования мишеней mTORC1, экспрессии мРНК *IGF-1* и снижение экспрессии мРНК миостатина. При этом в гипертрофированных мышцах экспрессия изоформ *PGC-1 α* с альтернативного (*PGC-1 α -b* и *NT-PGC-1 α -b*, праймеры к экзонам 1b и 2) и канонического (*PGC-1 α -a* и *NT-PGC-1 α -a*, праймеры к экзонам 1a и 2) промоторов оказалась сниженной, так же как содержание и активность ключевых митохондриальных белков и экспрессия генов-мишеней *PGC-1 α* , регулирующих окислительные реакции и углеводно-жировой обмен. В скелетных мышцах мышцей с нокаутом гена *PGC-1 α* , как и у мышцей дикого типа, в ответ на удаление синергистов наблюдалось сопоставимое увеличение объема мышцей, абсолютного уровня фосфорилирования мишеней mTORC1, экспрессии мРНК *IGF-1* и снижение экспрессии мРНК миостатина. Сделан вывод, что *PGC-1 α* не вовлечен в ремоделирование скелетной мышцей, вызванное хрониче-

ской нагрузкой. Этот вывод косвенно согласуется с тем, что в скелетных мышцах мышцей экспрессия мРНК *NT-PGC-1 α -b* регулируется теми же стимулами, что и полноразмерной изоформы *PGC-1 α -b*, а именно, значительно возрастает при увеличении интенсивности аэробной нагрузки и при активации β 2-адренорецепторов с помощью кленбутерола [62]. Подводя итог сказанному, необходимо отметить, что механизмы регуляции синтеза белка в скелетной мышцей различными изоформами *PGC-1 α* не ясны и требуют дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок-коактиватор *PGC-1 α* является ключевым регулятором биогенеза митохондрий и углеводно-жирового обмена. Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что в скелетных мышцах грызунов и человека могут экспрессироваться несколько изоформ мРНК *PGC-1 α* , при этом паттерн их экспрессии может значительно изменяться после физических нагрузок. Это связано с тем, что в регуляции экспрессии с разных промоторов гена *PGC-1 α* участвуют различные сигнальные каскады, активируемые разными физиологическими стимулами. По-видимому, экспрессия с канонического (проксимального) промотора регулируется, главным образом, через активацию AMPK, а с альтернативного – через β 2-адренорецепторы. Функциональные свойства белков, продуктов экспрессии с разных промоторов, скорее всего, не отличаются. Поэтому существование двух сигнальных путей, регулирующих экспрессию гена *PGC-1 α* , предоставляет большие возможности для фармакологического воздействия на экспрессию этого гена. Это может иметь важное значение для лечения и профилактики различных заболеваний.

Все полноразмерные транскрипты, экспрессирующиеся как с канонического, так и с альтернативного промоторов, подвергаются сплайсингу. В результате этого синтезируются укороченные изоформы, свойства которых отличны от свойств полноразмерных изоформ. Укороченные изоформы значительно более устойчивы к деградации и преимущественно регулируют ангиогенез, тогда как полноразмерные изоформы – преимущественно биогенез митохондрий. Опубликовано сообщение [52] о том, что укороченные изоформы, в отличие от полноразмерных, могут участвовать в регуляции миогенеза, но эти данные требуют дополнительной проверки. Можно заключить, что существование нескольких изоформ *PGC-1 α* с широким спектром функциональных свойств расширяет способность организма адаптироваться к различным физиологическим воздействиям.

В регуляции экспрессии *PGC-1 α* в скелетных мышцах человека остается много неясного. Изучение

особенностей регуляции экспрессии различных изоформ и их функциональной роли может дать уникальную возможность целенаправленно влиять на экспрессию тех или иных изоформ с помощью физических упражнений и/или фармакологических средств. Такая возможность важна для больных

метаболическим синдромом, сахарным диабетом и, возможно, для спортсменов, тренирующих аэробные возможности. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-15-00768).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen B.K., Febbraio M.A. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012. V. 8. № 8. P. 457–465.
2. Miura S., Kai Y., Kamei Y., Ezaki O. // *Endocrinology.* 2008. V. 149. № 9. P. 4527–4533.
3. Zhang Y., Huypens P., Adamson A.W., Chang J.S., Henagan T.M., Boudreau A., Lenard N.R., Burk D., Klein J., Perwitz N., et al. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 47. P. 32813–32826.
4. Egan B., Carson B.P., Garcia-Roves P.M., Chibalin A.V., Sarsfield F.M., Barron N., McCaffrey N., Moyna N.M., Zierath J.R., O’Gorman D.J. // *J. Physiol.* 2010. V. 588. № 10. P. 1779–1790.
5. Brenmoehl J., Hoeflich A. // *Mitochondrion.* 2013. V. 13. № 6. P. 755–761.
6. Wright D.C., Han D.H., Garcia-Roves P.M., Geiger P.C., Jones T.E., Holloszy J.O. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 1. P. 194–199.
7. Safdar A., Little J.P., Stokl A.J., Hettinga B.P., Akhtar M., Tarnopolsky M.A. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 12. P. 10605–10617.
8. Little J.P., Safdar A., Cermak N., Tarnopolsky M.A., Gibala M.J. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010. V. 298. № 4. P. R912–R917.
9. Little J.P., Safdar A., Bishop D., Tarnopolsky M.A., Gibala M.J. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. № 6. P. R1303–R1310.
10. McGee S.L., Howlett K.F., Starkie R.L., Cameron-Smith D., Kemp B.E., Hargreaves M. // *Diabetes.* 2003. V. 52. № 4. P. 926–928.
11. McGee S.L., Hargreaves M. // *Diabetes.* 2004. V. 53. № 5. P. 1208–1214.
12. Handschin C., Rhee J., Lin J., Tarr P.T., Spiegelman B.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 12. P. 7111–7116.
13. Dumke C.L., Mark D.J., Angela M.E., Nieman D.C., Carmichael M.D., Quindry J.C., Travis T.N., Utter A.C., Gross Gowan S.J., Henson D.A., et al. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009. V. 107. № 4. P. 419–427.
14. Olesen J., Kiilerich K., Pilegaard H. // *Pflugers Arch.* 2010. V. 460. № 1. P. 153–162.
15. Scarpulla R.C. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1147. P. 321–334.
16. Litonin D., Sologub M., Shi Y., Savkina M., Anikin M., Falkenberg M., Gustafsson C.M., Temiakov D. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 24. P. 18129–18133.
17. Smith B.K., Mukai K., Lally J.S., Maher A.C., Gurd B.J., Heigenhauser G.J., Spriet L.L., Holloway G.P. // *J. Physiol.* 2013. V. 591. № 6. P. 1551–1561.
18. Aquilano K., Vigilanza P., Baldelli S., Pagliari B., Rotilio G., Ciriolo M.R. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 28. P. 21590–21599.
19. Arany Z., Foo S.Y., Ma Y., Ruas J.L., Bommi-Reddy A., Girnun G., Cooper M., Laznik D., Chinsomboon J., Rangwala S.M., et al. // *Nature.* 2008. V. 451. № 7181. P. 1008–1012.
20. Chinsomboon J., Ruas J., Gupta R.K., Thom R., Shoag J., Rowe G.C., Sawada N., Raghuram S., Arany Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 50. P. 21401–21406.
21. Rowe G.C., Raghuram S., Jang C., Nagy J.A., Patten I.S., Goyal A., Chan M.C., Liu L.X., Jiang A., Spokes K.C., et al. // *Circ. Res.* 2014. V. 115. № 5. P. 504–517.
22. Puigserver P., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. // *Cell.* 1998. V. 92. № 6. P. 829–839.
23. Esterbauer H., Oberkofler H., Krempler F., Patsch W. // *Genomics.* 1999. V. 62. № 1. P. 98–102.
24. Czubryt M.P., McAnally J., Fishman G.I., Olson E.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 1711–1716.
25. Akimoto T., Li P., Yan Z. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. V. 295. № 1. P. C288–C292.
26. Lu J., McKinsey T.A., Nicol R.L., Olson E.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 8. P. 4070–4075.
27. McGee S.L., Fairlie E., Garnham A.P., Hargreaves M. // *J. Physiol.* 2009. V. 587. № 24. P. 5951–5958.
28. Hook S.S., Means A.R. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. V. 41. P. 471–505.
29. Corton J.M., Gillespie J.G., Hardie D.G. // *Curr. Biol.* 1994. V. 4. № 4. P. 315–324.
30. Chen Z.P., Stephens T.J., Murthy S., Canny B.J., Hargreaves M., Witters L.A., Kemp B.E., McConell G.K. // *Diabetes.* 2003. V. 52. № 9. P. 2205–2212.
31. Fujii N., Hayashi T., Hirshman M.F., Smith J.T., Habinowski S.A., Kaijser L., Mu J., Ljungqvist O., Birnbaum M.J., Witters L.A., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 273. № 3. P. 1150–1155.
32. Rose A.J., Kiens B., Richter E.A. // *J. Physiol.* 2006. V. 574. № 3. P. 889–903.
33. Sriwijitkamol A., Coletta D.K., Wajsborg E., Balbontin G.B., Reyna S.M., Barrientes J., Eagan P.A., Jenkinson C.P., Cersosimo E., DeFronzo R.A., et al. // *Diabetes.* 2007. V. 56. № 3. P. 836–848.
34. Rasmussen B.B., Winder W.W. // *J. Appl. Physiol.* 1997. V. 83. № 4. P. 1104–1109.
35. Shaywitz A.J., Greenberg M.E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. V. 68. P. 821–861.
36. Thomson D.M., Herway S.T., Fillmore N., Kim H., Brown J.D., Barrow J.R., Winder W.W. // *J. Appl. Physiol.* 2008. V. 104. № 2. P. 429–438.
37. Zhang Y., Ugucioni G., Ljubcic V., Irrcher I., Iqbal S., Singh K., Ding S., Hood D.A. // *Physiol. Rep.* 2014. V. 2. e12008.
38. Akimoto T., Pohnert S.C., Li P., Zhang M., Gumbs C., Rosenberg P.B., Williams R.S., Yan Z. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 20. P. 19587–19593.
39. Wright D.C., Geiger P.C., Han D.H., Jones T.E., Holloszy J.O. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 26. P. 18793–18799.
40. Widegren U., Jiang X.J., Krook A., Chibalin A.V., Bjornholm M., Tally M., Roth R.A., Henriksson J., Wallberg-Henriksson H., Zierath J.R. // *FASEB J.* 1998. V. 12. № 13. P. 1379–1389.
41. Nordsborg N.B., Lundby C., Leick L., Pilegaard H. // *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010. V. 42. № 8. P. 1477–1484.
42. Popov D., Zinovkin R., Karger E., Tarasova O., Vinogradova O. // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2014. V. 54. P. 362–369.

43. Edgett B.A., Foster W.S., Hankinson P.B., Simpson C.A., Little J.P., Graham R.B., Gurd B.J. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 8. e71623.
44. Yoshioka T., Inagaki K., Noguchi T., Sakai M., Ogawa W., Hosooka T., Iguchi H., Watanabe E., Matsuki Y., Hiramatsu R., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 381. № 4. P. 537–543.
45. Soyat S.M., Felder T.K., Auer S., Hahne P., Oberkofler H., Witting A., Paulmichl M., Landwehrmeyer G.B., Weydt P., Patsch W. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 15. P. 3461–3473.
46. Felder T.K., Soyat S.M., Oberkofler H., Hahne P., Auer S., Weiss R., Gadermaier G., Miller K., Krempler F., Esterbauer H., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 50. P. 42923–42936.
47. Miura S., Kawanaka K., Kai Y., Tamura M., Goto M., Shiuchi T., Minokoshi Y., Ezaki O. // *Endocrinology*. 2007. V. 148. № 7. P. 3441–3448.
48. Tadaishi M., Miura S., Kai Y., Kawasaki E., Koshinaka K., Kawanaka K., Nagata J., Oishi Y., Ezaki O. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011. V. 300. № 2. P. E341–E349.
49. Norrbom J., Sallstedt E.K., Fischer H., Sundberg C.J., Rundqvist H., Gustafsson T. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011. V. 301. № 6. P. E1092–E1098.
50. Popov D.V., Bachinin A.V., Lysenko E.A., Miller T.F., Vinogradova O.L. // *J. Physiol. Sci.* 2014. V. 64. № 5. P. 317–323.
51. Ydfors M., Fischer H., Mascher H., Blomstrand E., Norrbom J., Gustafsson T. // *Physiol. Rep.* 2013. V. 1. № 6. e00140.
52. Ruas J.L., White J.P., Rao R.R., Kleiner S., Brannan K.T., Harrison B.C., Greene N.P., Wu J., Estall J.L., Irving B.A., et al. // *Cell*. 2012. V. 151. № 6. P. 1319–1331.
53. Tadaishi M., Miura S., Kai Y., Kano Y., Oishi Y., Ezaki O. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. e28290.
54. Chang J.S., Fernand V., Zhang Y., Shin J., Jun H.J., Joshi Y., Gettys T.W. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 12. P. 9100–9111.
55. Kim S.H., Asaka M., Higashida K., Takahashi Y., Holloszy J.O., Han D.H. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 304. № 8. P. E844–E852.
56. Frier B.C., Wan Z., Williams D.B., Stefanson A.L., Wright D.C. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012. V. 302. № 12. P. C1772–C1779.
57. Baar K., Wende A.R., Jones T.E., Marison M., Nolte L.A., Chen M., Kelly D.P., Holloszy J.O. // *FASEB J.* 2002. V. 16. № 14. P. 1879–1886.
58. Chang J.S., Huypens P., Zhang Y., Black C., Kralli A., Gettys T.W. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 23. P. 18039–18050.
59. Shen T., Liu Y., Schneider M.F. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2012. P. 989263.
60. Sano M., Tokudome S., Shimizu N., Yoshikawa N., Ogawa C., Shirakawa K., Endo J., Katayama T., Yuasa S., Ieda M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 35. P. 25970–25980.
61. Olson B.L., Hock M.B., Ekholm-Reed S., Wohlschlegel J.A., Dev K.K., Kralli A., Reed S.I. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 2. P. 252–264.
62. Wen X., Wu J., Chang J.S., Zhang P., Wang J., Zhang Y., Gettys T.W., Zhang Y. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. e 402175.
63. Thom R., Rowe G.C., Jang C., Safdar A., Arany Z. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 8810–8817.
64. Jun H.J., Gettys T.W., Chang J.S. // *PPAR. Res.* 2012. V. 2012. e320454.
65. Leone T.C., Lehman J.J., Finck B.N., Schaeffer P.J., Wende A.R., Boudina S., Courtois M., Wozniak D.F., Sambandam N., Bernal-Mizrachi C., et al. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 4. e101.
66. Jun H.J., Joshi Y., Patil Y., Noland R.C., Chang J.S. // *Diabetes*. 2014. V. 63. № 11. P. 3615–3625.
67. Arany Z., He H., Lin J., Hoyer K., Handschin C., Toka O., Ahmad F., Matsui T., Chin S., Wu P.H., et al. // *Cell Metab.* 2005. V. 1. № 4. P. 259–271.
68. Lin J., Wu P.H., Tarr P.T., Lindenberg K.S., St-Pierre J., Zhang C.Y., Mootha V.K., Jager S., Vianna C.R., Reznick R.M., et al. // *Cell*. 2004. V. 119. № 1. P. 121–135.
69. Handschin C., Choi C.S., Chin S., Kim S., Kawamori D., Kurpad A.J., Neubauer N., Hu J., Mootha V.K., Kim Y.B., et al. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. № 11. P. 3463–3474.
70. Handschin C., Chin S., Li P., Liu F., Maratos-Flier E., LeBrasseur N.K., Yan Z., Spiegelman B.M. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 41. P. 30014–30021.
71. Perez-Schindler J., Summermatter S., Santos G., Zorzato F., Handschin C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 50. P. 20314–20319.

УДК 577.1; 577.15

Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных формиаатдегидрогеназ

А. А. Алексеева^{1,2}, В. В. Федорчук^{2,3}, С. А. Зарубина^{2,3}, Э. Г. Садыхов¹, А. Д. Маторин³,
С. С. Савин^{1,2,3}, В. И. Тишков^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, оф. 96

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2014

РЕФЕРАТ Согласно данным рентгеноструктурного анализа, остаток Ala198, расположенный в коферментсвязывающем домене NAD⁺-зависимых формиаатдегидрогеназ [КФ 1.2.1.2] (ФДГ) из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 (PseFDH и MorFDH соответственно), имеет неоптимальные значения углов ψ и ϕ . Методом направленного мутагенеза этот остаток был заменен на остаток Gly. Мутантные PseFDH A198G и MorFDH A198G экспрессировали в клетках *Escherichia coli* и получили в высокоочищенном (> 95% чистоты) виде. Исследование кинетики термоинактивации показало, что PseFDH A198G и MorFDH A198G в 2.5 раза более стабильны, чем соответствующие ферменты дикого типа. Анализ кинетических свойств свидетельствует, что введение замены A198G в PseFDH и MorFDH приводит к уменьшению величины K_m по NAD⁺ с 60 до 35 и с 80 до 45 мкМ соответственно, в то время как величина K_m по формиаату остается неизменной. Замена A198G была введена также в мутантную PseFDH D221S, коферментная специфичность которой была изменена от NAD⁺ к NADP⁺. В этом случае также наблюдалось увеличение термостабильности, однако эффект на кинетические параметры был противоположным – константа Михаэлиса по NADP⁺ увеличилась с 190 до 280 мкМ, а по формиаату возросла с 43 до 89 мМ. Полученные данные позволяют с высокой вероятностью предположить, что ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 ранее была NADP⁺-, а не NAD⁺-зависимым ферментом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кинетические параметры, коферментная специфичность, направленный мутагенез, субстратная специфичность, термостабильность, формиаатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Отличительная особенность NAD⁺-зависимых дегидрогеназ – наличие в их коферментсвязывающем домене характеристической последовательности (fingerprint) GxGxxG [1]. Фактически единственное исключение из этого правила представляют формиаатдегидрогеназы из бактерий и микроскопических грибов [КФ 1.2.1.2] (ФДГ). Практически во всех бактериальных ФДГ (кроме ферментов из симбиотических бактерий *Sinorhizobium meliloti* и из бактерий родов *Bordetella* и *Staphylococcus*) в первом положении последовательности GxGxxG вместо остатка Gly расположен остаток Ala (рис. 1). Аналогичная картина наблюдается и в ферментах из микроскопических грибов, тогда как все известные ФДГ из различных дрожжей и растений подчиняются указанному правилу и имеют классическую характеристическую последовательность.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования ФДГ из различных источников, в том числе из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 (PseFDH и MorFDH соответственно). В обоих ферментах неканонический остаток Ala находится в положении 198. В сотрудничестве с лабораторией В.О. Попова (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН), В.С. Ламзина (EMBL Outstation, Hamburg) и группой К.М. Полякова (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) были определены трехмерные структуры как свободных ферментов, так и их различных комплексов [2–5]. В структурах обоих ферментов остаток Ala198 имеет «запрещенные» значения углов ψ и ϕ , что мешает оптимальной ориентации вторичных структурных элементов (рис. 2). Данные рентгеноструктурного анализа PseFDH и MorFDH свидетельствуют,

что остаток Ala198 расположен между β A-тяжом и α B-спиралью (рис. 3А).

В представленной работе для снятия конформационного напряжения в структуре и выяснения роли Ala198 в стабильности и каталитических свойствах PseFDH и MorFDH методом направленного мутагенеза этот остаток был заменен на остаток Gly. Кроме того, мутация Ala198Gly была введена в PseFDH с заменой Asp221Ser, полученную ранее в нашей лаборатории. В результате последней замены коферментная специфичность PseFDH изменилась с NAD⁺ к NADP⁺ [6, 7], поэтому было важно определить, как снятие конформационного напряжения повлияет на стабильность и коферментную специфичность NADP⁺-специфичной PseFDH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Генно-инженерные эксперименты проводили с использованием реактивов 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), хлорид натрия («ч. д. а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и Pfu-ДНК-полимеразу фирмы Thermo Scientific (США) использовали для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК. Для очистки ДНК из агарозного геля и выделения плазмид из клеток *E. coli* использовали наборы реагентов фирмы Thermo Scientific (США). Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Во всех экспериментах по модификации ДНК использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

Все реактивы, использованные для электрофореза белков, произведены фирмой Bio-Rad (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли сульфат аммония марки «х. ч.» («Диам», Россия), мочевины марки «ч. д. а.» («РеаХим», Россия), NAD⁺ и NADP⁺ с чистотой не менее 99% фирмы AppliChem (Германия), EDTA, формиат натрия и дигидрофосфат натрия pure for analysis фирмы Merck (Германия), азид натрия фирмы Serva (Германия).

Реакции направленного мутагенеза

Точечные замены вводили с помощью двустадийной ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиды pPseFDH8, pPseFDH8_D221S и pMorFDH2, в которых гены *psefdh* и *morfdh* находятся под контро-

лем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7. Для введения мутаций использовали прямой (T7_For) и обратный (T7_Rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdh*. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены ниже.

T7_For	5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3'
T7_Rev	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
PseFDH_A198G_for	5'-GTCGGCACCGTGGGCGCCGGTGCATCGGT-3'
PseFDH_A198G_rev	5'-CGACCGGCGCCACGGTCCGACATGCATCG-3'
MorFDH_A198G_for	5'-CACCGTGGCCGCGCCGCGCATCGGCCTG-3'
MorFDH_A198G_rev	5'-TGCGGCCGCGCGCACGGTCCGACATGCATG-3'.

Реакционная смесь для ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu-ДНК-полимеразы (200 мМ трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ КСl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2.5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2.5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (≈10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0.5 мкл Pfu-ДНК-полимеразы (2.5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0.5 мл (SSI, США) на приборе Терцик («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку также добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C, а затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95°C, 30 с; связывание праймеров – 54–58°C, удлинение цепи – 72°C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 5 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5°C ниже температуры плавления дуплексов (T_{пл}), образуемых праймерами.

При проведении первых двух ПЦР в случае PseFDH использовали праймеры T7_For/PseFDH_A198G_rev (фрагмент 1) и PseFDH_A198G_for/T7_Rev (фрагмент 2). Для MorFDH использовали пары T7_For/MorFDH_A198G_rev и MorFDH_A198G_for/T7_Rev (фрагменты 1 и 2 соответственно). Продукты ПЦР – фрагмент 1 и фрагмент 2, очищали электрофорезом в 1% агарозном геле. Затем проводили третью, объединяющую ПЦР с праймерами T7For и T7Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали очищенные фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР – очищали так же, как фрагменты 1 и 2, и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI и EcoRI. Затем ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле с последующей экстракцией из геля и лигировали с плазмидами pPseFDH8, pPseFDH8_D221S

и pMorFDH2, расщепленных теми же эндонуклеазами рестрикции. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5 α , высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и выдерживали в течение 16 ч при 37°C. Брали по три колонии каждого мутанта PseFDH A198G, PseFDH A198G/D221S и MorFDH A198G с чашки и из них выделяли плазмиды. Правильность введения мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных FDH в клетках *E. coli*

PseFDH и MorFDH дикого типа и их мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. С целью получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала отбирали единичную колонию, которую культивировали в течение 7–9 ч при 30°C и 180 об/мин в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7.0) в присутствии 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола до достижения $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Затем содержимое пробирок переносили в конические качалочные колбы с отбойниками объемом 1 л, содержащими 200 мл среды 2YT и 100 мкг/мл ампициллина, и клетки культивировали при 30°C и 80–90 об/мин до достижения $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Далее клетки индуцировали, добавляя в среду культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч при 120 об/мин. Биомассу осаждали на центрифуге Beckman J-21 (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4°C, после удаления культуральной жидкости клетки ресуспендировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 в соотношении 1 : 4 (масс./объем). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20°C.

Выделение и очистка

Ферменты очищали с использованием методики, разработанной для получения рекомбинантной PseFDH дикого типа [8]. Из полученной биомассы готовили 20% (w/v) суспензию клеток, содержащих PseFDH и MorFDH дикого типа и их мутанты, в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0. Полученные суспензии подвергали двум циклам замораживания–оттаивания, затем клетки разрушали с использованием ультра-

тразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804 R (11000 об/мин, 30 мин), а к супернатанту добавляли по каплям насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации, равной 35% от насыщения. Полученный раствор инкубировали в течение нескольких часов при 4°C. Осадок отделяли с помощью центрифугирования на центрифуге Beckman J21 при 20000 об/мин (30 мин, 4°C), а супернатант использовали для гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) в нисходящем градиенте 35–0% концентрации сульфата аммония в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Собирали активные фракции, раствор фермента концентрировали в ячейке через мембрану PM-10 (Amicon). Далее препарат фермента обессоливали на колонке с Сефадексом G-25 в том же буфере. Чистоту препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза MiniProtean II фирмы BioRad.

Измерение активности формиатдегидрогеназы

Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH (NADPH) на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV 1800 PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Концентрация формиата натрия и NAD(P)⁺ в кювете составляла 0.6 М и 1 мг/мл соответственно.

Определение констант Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD⁺, NADP⁺ и формиату определяли из зависимостей активности фермента от концентрации (0.4–6 K_M) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей (> 15 K_M). Точные концентрации исходных растворов NAD⁺ и NADP⁺ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Раствор формиата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Объем раствора доводили в мерной колбе. Значения K_M рассчитывали из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5.

Изучение кинетики термоинактивации

Термостабильность ферментов измеряли в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0 при нескольких температурах. Для каждого эксперимента готовили серию пластиковых пробирок объемом 0.5 мл, содержащих

по 100 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (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 ФДГ измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации k_m определяли как величину тангенса угла наклона прямой из графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Компьютерное моделирование

Структуры мутантных PseFDH и MorFDH моделировали с помощью пакета Insight II (Accelrys), используя в качестве базовой структуру холо-форм PseFDH (2NAD, разрешение 2.05 Å) и MorFDH (3FN4, разрешение 1.96 Å). Дополнительную оптимизацию полученной структуры проводили с помощью молекулярной механики (модуль Discover_3 в Insight II, силовое поле CVFF, 1000 циклов), молекулярной динамики (5 пс) и повторно молекулярной механики (1000 циклов). Структуры PseFDH и MorFDH анализировали с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1. Этот же пакет использовали для получения изображений белковой глобулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор положений для направленного введения аминокислотных замен

Ферменты с заданными свойствами можно успешно получить при помощи методов белковой инженерии. Один из широко используемых подходов – рациональный дизайн. На первом этапе детально анализируют трехмерную структуру целевого фермента и осуществляют выбор положений для направленного введения аминокислотных замен. Далее проводят множественное выравнивание аминокислотных последовательностей в районе, выбранном для замены положений, чтобы определить тип вводимых остатков. Окончательный выбор типа вводимых в определенное положение остатков осуществляют после анализа модельных структур вероятных мутантов. Мы применили метод рационального дизайна для двух формиатдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1.

Известно, что участок активного центра, ответственный за связывание рибозной части кофермента, обладает рядом структурных закономерностей,

характерных для NAD(P)^+ -зависимых дегидрогеназ. У большинства ферментов этой группы кофермент-связывающий домен состоит из двух субдоменов, отвечающих за связывание адениновой и никотинамидной частей кофермента. Каждый из этих субдоменов состоит из чередующихся β -тяжей и α -спиралей. Эта структура получила название «укладка Россмана» (Rossmann fold) [9]. Общее количество и чередование β -тяжей и α -спиралей может быть разным. Различные варианты укладки проанализированы в работе [10]. Консервативный мотив GxGxxG расположен в участке, соединяющем первые тяж β -листа и α -цепь укладки Россмана. Первый остаток глицина за счет высокой подвижности обеспечивает оптимальное взаимное расположение указанных вторичных структур, необходимое, в свою очередь, для правильной ориентации второго остатка глицина этого мотива. Второй остаток Gly благодаря этому оказывается в непосредственной близости от фосфатной части кофермента и участвует в ее связывании. Предполагается, что присутствие в этом положении любого остатка с более объемным боковым радикалом будет приводить к сильным стерическим затруднениям при связывании кофермента. Третий остаток важен для плотной упаковки структурных элементов αA и βB и их взаимной ориентации.

На *рис. 1* представлено выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных организмов в районе начала коферментсвязывающего домена (фрагмент β - α - β). Из этого выравнивания видно, что у части формиатдегидрогеназ из бактерий и микроскопических грибов в первом положении характеристической последовательности вместо остатка Gly расположен Ala. В ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 этот остаток Ala находится в положении 198. Согласно картам Рамачандрана в структурах апоформ PseFDH и MorFDH (2NAC и 3FN4 соответственно) значения углов ψ и ϕ остатка Ala198 далеки от оптимальных (*рис. 2А,Б*).

Как видно из *рис. 3А* в тройном комплексе PseFDH с NAD^+ и азид-ионом (структура 2NAD рассматривается как аналог переходного состояния) метильная группа остатка Ala ориентирована в сторону 3'-ОН-группы рибозы аденозина. Результаты компьютерного моделирования показывают, что замена Ala198Gly в PseFDH снимает конформационное напряжение (*рис. 3Б*). Аналогичная ситуация наблюдается и для MorFDH (структура 2GSD, на *рис. 3* не показано). Основываясь на данных компьютерного моделирования, мы решили получить мутантные PseFDH и MorFDH, в которых остаток Ala198 заменен на Gly.

Замену Ala198Gly также было решено ввести в полученную ранее мутантную PseFDH, кофер-

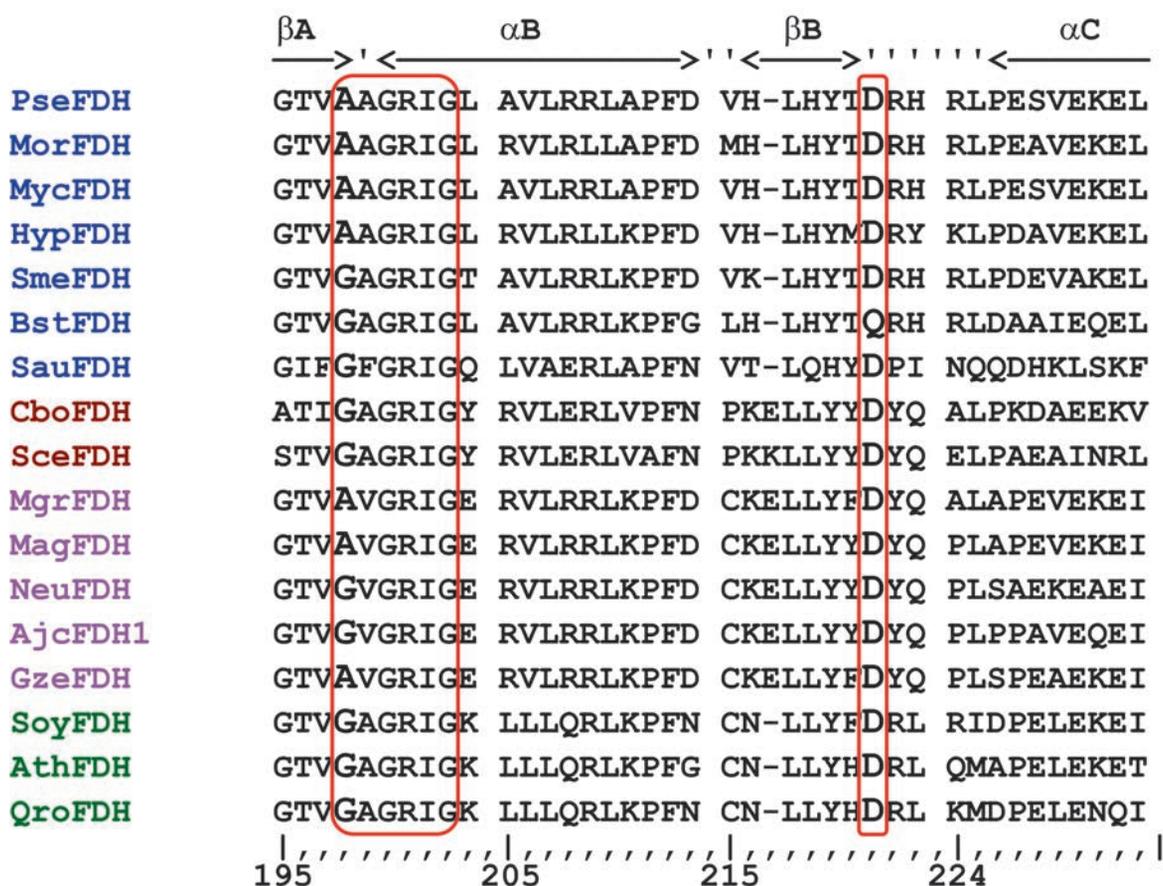


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из различных источников в районе начала коферментсвязывающего домена. Синим цветом обозначены ФДГ из бактерий: PseFDH – *Pseudomonas* sp. 101 (UniProtKB/Swiss-Prot: P33160.3), MorFDH – *Moraxella* sp. C-1 (GenBank Accession Y13245), MycFDH – *Mycobacterium vaccae* N10 (GenBank BAB69476), HypFDH – *Hyphomicrobium* штамм JC-17 (GenBank BAB55449), SmeFDH – *Sinorhizobium meliloti* 16262453 (GenBank NP_435497), BstFDH – *Burkholderia stabilis* (GenBank CP000378), SauFDH – *Staphylococcus aureus* (NCBI Reference Sequence: WP_031923037.1); коричневым – из дрожжей: CboFDH – *Candida boidinii* (GenBank Accession ABE69165), SceFDH – пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL Z75296); маджентой – из микроскопических грибов: MgrFDH – *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) (UniProt Q9Y790), MagFDH – *Magnaporthe grisea* (EMBL AA415108), NeuFDH – *Neurospora crassa* (GenBank Accession XP_961202), AjcFDH – *Ajellomyces capsulatus* (GenBank Accession XP_001539240), GzeFDH – ФДГ из микроскопических грибов *Gibberella zeae* (GenBank Accession XM_386303); и зеленым цветом – из растений: SoyFDH – соя *Glycine max* (GenBank Accession GB_BT094321), AthFDH – резуховидка Таля *Arabidopsis thaliana* (EMBL AF208029), QroFDH – дуб *Quercus robur* (GenBank Accession GB_AJ577266)

ментная специфичность которой изменилась с NAD⁺ к NADP⁺. Такой эффект был достигнут за счет точечной замены Asp221Ser (рис. 3B). Результаты компьютерного моделирования показали (рис. 3B), что за счет остатка Ala198 стерическое напряжение в структуре мутантного фермента в комплексе с NADP⁺ не такое сильное, как у фермента дикого типа. Тем не менее в результате замены Ala198Gly должна появиться дополнительная полость, которая позволила бы более эффективно связывать 3'-фосфатную группу кофермента (рис. 3Г).

Получение мутантных ферментов

После проведения мутагенеза с помощью полимеразной цепной реакции для каждого из трех мутантов – PseFDH Ala198Gly, PseFDH Ala198Gly/Asp221Ser и MorFDH Ala198Gly, было выделено по три плазмиды. Результаты секвенирования показали, что все плазмиды содержали только требуемые мутации в генах *psefdh* и *morfdh*, а другие нуклеотидные замены отсутствовали. Для получения мутантных вариантов ферменты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Обе мутантные PseFDH, а также

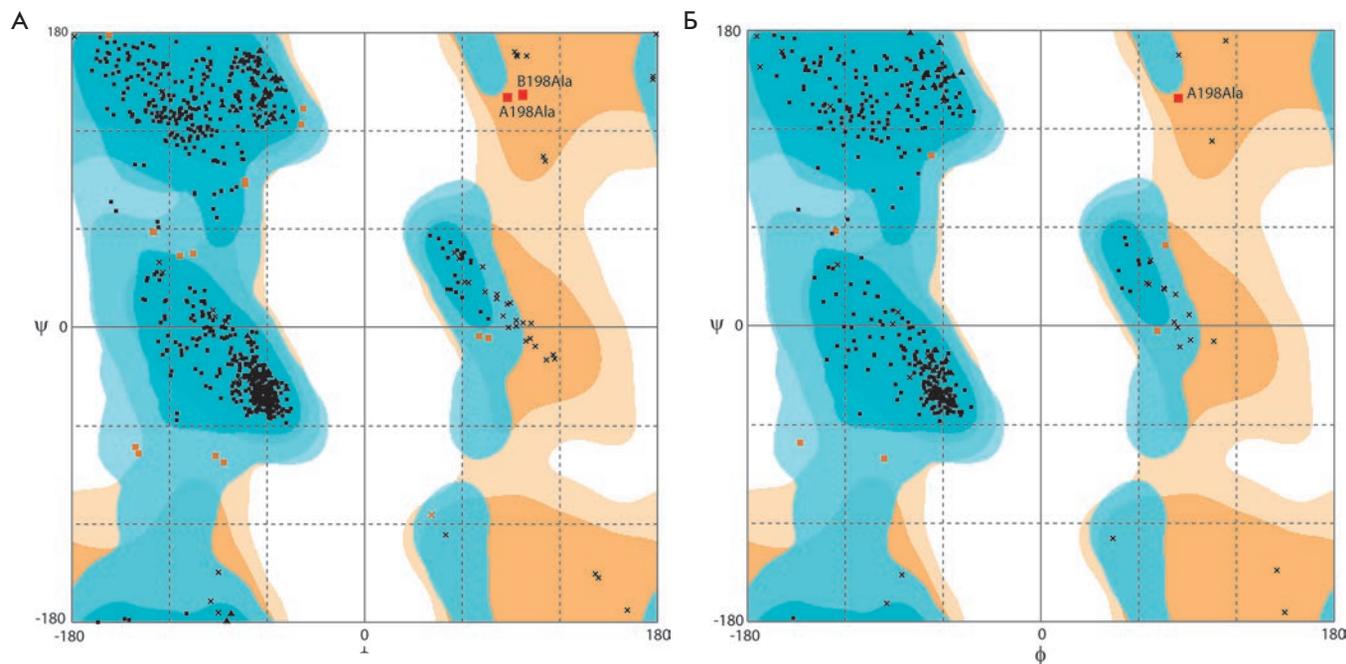


Рис. 2. Карта Рамачандрана для структур апо-форм форматдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (А) (PDB2NAC) и *Moraxella* sp. C-1 (Б) (PDB3FN4). Для MorFDH указана только одна пара углов ψ и ϕ , так как в кристаллографическую ячейку входит всего одна субъединица

Таблица 1. Константы скорости термоинактивации и активационные параметры мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Мутант/ T , °C	k_{in} , $10^{-5} \cdot c^{-1}$				ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
	60.1	62.0	63.0	65.0		
wt-PseFDH	5.4 ± 0.2	22 ± 2	32 ± 2	140 ± 12	570 ± 20	1390 ± 70
PseFDH A198G	2.7 ± 0.1	9.3 ± 0.5	13 ± 0.8	60 ± 5	580 ± 30	1410 ± 80
PseFDH D221S	9.2 ± 0.5	32 ± 4	69 ± 7	188 ± 15	570 ± 40	1410 ± 100
PseFDH D221S/ A198G	2.7 ± 0.1	8.9 ± 0.4	20 ± 3	52 ± 6	580 ± 30	1380 ± 110

мутантная MorFDH экспрессировались в активной и растворимой форме. Они были выделены по методике, представленной в разделе «Экспериментальная часть». Чистота мутантных ферментов согласно данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия составляла не менее 95%.

Изучение температурной стабильности мутантных форматдегидрогеназ

Термостабильность полученных мутантных PseFDH и MorFDH определяли по кинетике инактивации при нескольких температурах. У PseFDH дикого типа и ее мутантов диапазон температур, в котором проводили измерения, составил 60–65°C (табл. 1).

Во всем диапазоне инактивация проходила в соответствии с реакцией первого порядка (рис. 4). Из величин тангенсов углов наклона этих прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Величина константы скорости инактивации не зависела от концентрации фермента во всем диапазоне температур, что свидетельствовало об истинном мономолекулярном механизме процесса. Численные значения констант скорости термоинактивации приведены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что у мутантной PseFDH с заменой Ala198Gly стабильность при всех температурах примерно в 2–2.5 раза выше, чем у фермента дикого типа. Аналогичный по величине эффект увеличения термостабильности наблюдался и в паре нативная и мутантная MorFDH A198G, одна-

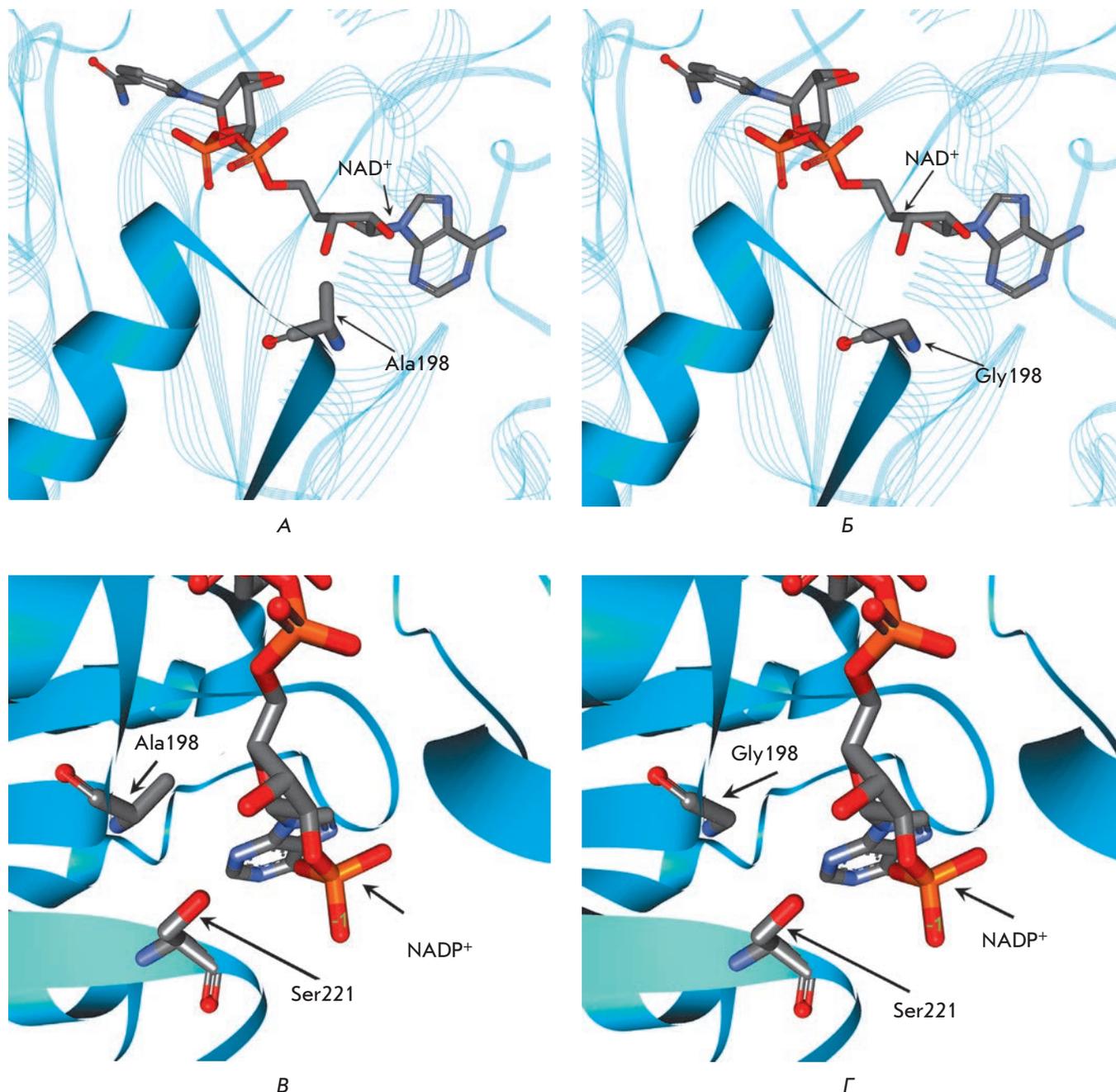


Рис. 3. Фрагменты структур форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. А – фермент дикого типа в комплексе с NAD⁺ и азид-ионом (2NAD), Б – модельная структура мутантной PseFDH A198G с NAD⁺; В и Г – модельные структуры мутантных PseFDH D221S и PseFDH A198G/D221S в комплексе с NADP⁺ соответственно

ко в силу того, что MorFDH в 25 раз менее стабильна, чем PseFDH [11], кинетику инактивации изучали при более низких температурах (56–62°C).

Мутантная NADP⁺-специфичная PseFDH Asp221Ser менее стабильна, чем исходная NAD⁺-зависимая PseFDH (рис. 4 и табл. 1). Замена Ala198Gly в PseFDH Asp221Ser приводит к суще-

ственному повышению термостабильности, причем эффект стабилизации даже немного выше, чем введение аналогичной замены в фермент дикого типа (табл. 1). Полученные данные указывают на то, что метильная группа остатка Ala198 является важным дестабилизирующим фактором в этой области белковой глобулы. Аналогичный стабилизирующий

Таблица 2. Кинетические параметры природных и мутантных форматдегидрогеназ

Фермент*	$K_m^{NAD^+}$, мкМ	$K_m^{NADP^+}$, мкМ	$K_m^{HCOO^-}$, мМ	k_{cat} , с ⁻¹	$k_{cat}/K_m^{NAD^+}$, мМ ⁻¹ с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹ мут/вт	Ссылка
Реакция с NAD ⁺							
wt-PseFDH	60 ± 5		6.5 ± 0.2	7.3 ± 0.2	122	1	[14]
PseFDH A198G	35 ± 2		7.5 ± 0.2	7.3 ± 0.1	209	1.713	Настоящая работа
PseFDH D221S	710 ± 45		32 ± 2	5.0 ± 0.3	7.04	0.058	Настоящая работа
PseFDH D221S/ A198G	540 ± 42		53 ± 1	5.0 ± 0.2	9.26	0.076	Настоящая работа
MorFDH	80 ± 7		7.7 ± 0.3	7.3 ± 0.1	91.3	1	[14]
MorFDH A198G	45 ± 3		8.0 ± 0.5	7.3 ± 0.3	162	1.774	Настоящая работа
BstFDH	1430		≥150	1.7 ± 0.1	1.19	–	[15]
wt-CmeFDH	55		НД	1.4	25.5	–	[16]
CmeFDH D195S	4700		7.0	1.6	0.34	–	[16]
wt-CboFDH	15		5.9	3.7	246.7	–	[17]
CboFDH D195S	1500		НД	0.34	0.227	9.2 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195N	5010		НД	0.21	0.04	1.7 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195A	4800		НД	0.76	0.158	6.4 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195Q	960		НД	0.26	0.271	0.001	[17]
SceFDH	36		5.5	6.5	181	–	[18]
SceFDH D196A/Y197R	7600		1000	0.095	0.0125	–	[18]
Реакция с NADP ⁺							
wt-PseFDH		100000*	НД	1.3 ± 0.1	0.013	1	Настоящая работа
PseFDH D221S		190 ± 30	43	1.7 ± 0.2	3.04	234	[7]
PseFDH D221S/ A198G		280 ± 25	89	1.8 ± 0.2	6.43	495	Настоящая работа
wt-BstFDH		160	55.5	4.75	29.7	–	[15]
CmeFDH D195S		> 0.4М	НД	НД	НД	–	[16]
wt-CboFDH		>38000	НД	4 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	–	[17]
CboFDH D195S		6200	НД	0.34	0.055	55000	[17]
CboFDH D195N		13200	НД	0.26	0.0196	19600	[17]
CboFDH D195A		3300	НД	0.052	0.0157	15700	[17]
CboFDH D195Q		4500	НД	0.26	0.058	58000	[17]
SceFDH D196A/Y197R		4500	1000	0.13	0.03	–	[18]

*PseFDH, MorFDH, BstFDH, CmeFDH, CboFDH, SceFDH – форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Moraxella* sp. C-1, *Burkholderia stabilis* 15516, метилотрофных дрожжей *Candida methylca* и *C. boidinii* и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* соответственно.

эффект – уменьшение константы скорости инактивации в 2.5 раза – наблюдался и при введении замены Ala198Gly в MorFDH (на рисунке не показано).

Интересно было выяснить, какой из двух факторов – изменение энтальпии или энтропии, приводят к повышению стабильности полученных мутантов. С этой целью были проанализированы зависимости констант скорости инактивации от температуры. На рис. 5 представлены зависимости величины наблюдаемых констант скорости инактивации первого порядка k_{in} в координатах $\ln(k_{in}/T)$ от $1/T$, где T – температура в градусах Кельвина.

Линейная зависимость вторичных графиков свидетельствует, что процесс термоинактивации нативной и мутантных ФДГ описывается уравнением

зависимости константы скорости от температуры из теории активированного комплекса [12]. Это уравнение может быть представлено в линейном виде:

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

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

Параллельный ход прямых на рис. 5 свидетельствует о том, что процесс термоинактивации PseFDH дикого типа и ее мутантов характеризуется примерно одинаковыми величинами ΔH^\ddagger , а основной вклад

в увеличение стабильности ФДГ при введении мутации A198G обусловлен энтропийным фактором. Численные значения активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса термоинактивации представлены в табл. 1.

В заключение этого раздела отметим, что увеличение стабильности фермента в 2.5 раза за счет точечной замены является большим по величине эффектом. Ранее мы провели эксперименты по направленному мутагенезу других аминокислотных остатков в глобуле PseFDH с неоптимальными значениями углов ψ и ϕ , однако не достигли увеличения стабильности, так как эти остатки участвовали в образовании водородных связей, энергия которых превосходила энергию дестабилизации за счет неоптимальной конформации [13].

Кинетические свойства мутантных ферментов

Кинетические параметры полученных мутантов приведены в табл. 2. Для сравнения в этой же таблице приведены аналогичные параметры для других известных ФДГ. Как уже отмечалось выше, результаты компьютерного моделирования показали, что введение замены Ala198Gly обеспечивает большую подвижность α A-спирали коферментсвязывающего домена. Как следует из табл. 2 введение данной замены в NAD^+ -специфичные PseFDH и MorFDH дикого типа улучшает связывание кофермента – в обоих случаях константа Михаэлиса по NAD^+ уменьшилась почти в 2 раза, при этом константа Михаэлиса по формату практически не меняется. Отметим, что в общем случае константа Михаэлиса не является равновесной константой, однако катализируемая PseFDH и MorFDH реакция протекает по неупорядоченному квазиравновесному кинетическому механизму [11, 19, 20]. И в этом случае величина K_m как по NAD^+ , так и по формату является равновесной константой их связывания с соответствующим двойным комплексом.

Замена Asp221Ser приводила к ухудшению сродства фермента к NAD^+ и увеличению сродства к $NADP^+$ (табл. 2). Это легко объяснить, приняв во внимание тот факт, что такая замена убирает карбоксильную группу, которая обеспечивает специфичность к NAD^+ за счет водородных связей с 2'- и 3'-ОН-группами рибозы аденозина, и отталкивает отрицательно заряженную 2'-фосфатную группу $NADP^+$.

Введение второй замены Ala198Gly в мутантную $NADP^+$ -специфичную PseFDH Asp221Ser приводило, как и в случае фермента дикого типа, к улучшению сродства фермента к NAD^+ примерно в 1.5 раза, однако в случае $NADP^+$ сродство к коферменту наоборот ухудшалось примерно во столько же раз (табл. 2).

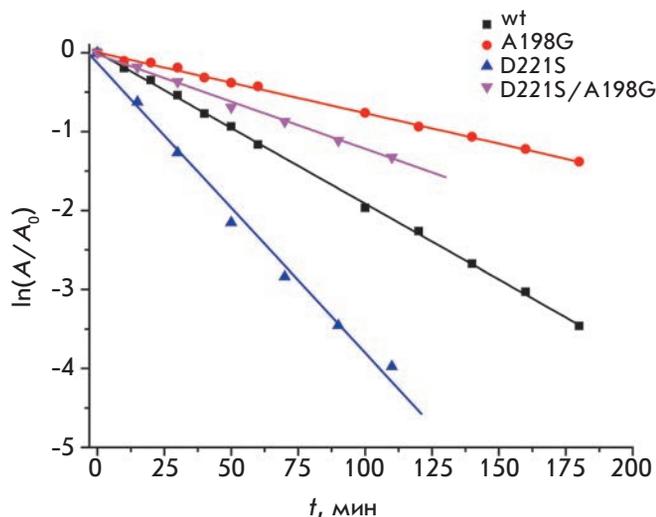


Рис. 4. Зависимость остаточной активности от времени для мутантных PseFDH Ala198Gly, PseFDH Ala198Gly / Asp221Ser и фермента дикого типа. 0.1 М фосфатный буфер pH 7.0, 63°C

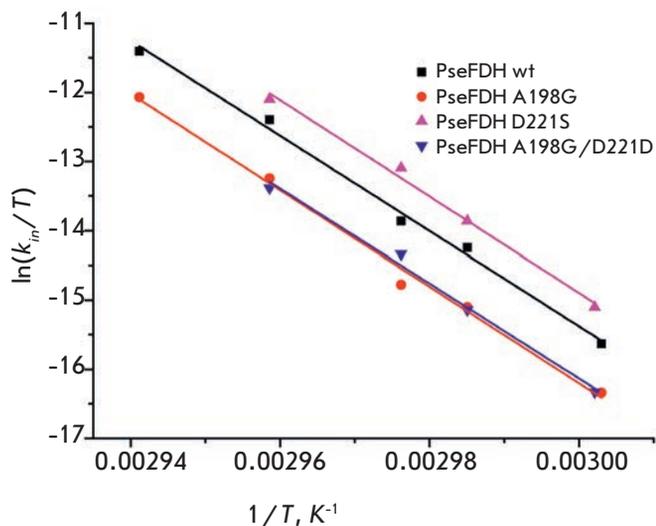


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ для мутантов PseFDH и фермента дикого типа

Кроме того, замена Ala198Gly в вышеуказанном мутанте вызывала существенное ухудшение сродства и к формату. Это, по-видимому, связано с тем, что основные структурные изменения белковой глобулы ФДГ, необходимые для образования тройного фермент-субстратного комплекса и переходного состояния ферментативной реакции, происходят на стадии связывании кофермента. Поэтому именно конформация двойного комплекса (ФДГ-кофермент) является определяющей для эффективного связыва-

ния формиата. Известно, что даже очень небольшие изменения в активном центре ФДГ приводят к довольно заметным изменениям в средстве к формиату. В табл. 2 для сравнения представлены данные для ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis*. Видно, что замена в положении 221 PseFDH позволяет приблизиться к значениям констант для этого природного NADP⁺-зависимого фермента.

Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу, объясняющую наличие «неканонического» остатка Ala в первом положении высококонсервативной «канонической» последовательности GxGxxG для коферментсвязывающего домена PseFDH. По всей видимости, этот фермент представляет собой промежуточный продукт эволюции формиатдегидрогеназы от NADP⁺- к NAD⁺-специфичной. На ранних стадиях развития живых систем, когда основными метаболическими путями были аэробные процессы, ФДГ, возможно, была NADP⁺-зависимым ферментом и обеспечивала получение NADPH для биосинтеза различных соединений. Наличие остатка Ala в положении 198 NADP⁺-зависимого фермента обеспечивало в 10 раз более эффективное связывание формиата, чем в случае Gly198. У этого фермента в положении 221 находился незаряженный аминокислотный остаток, а в положении 222 – положительно заряженный остаток Arg, необходимый для нейтрализации отрицательного заряда фосфатной группы NADP⁺. В процессе эволюции при появлении метилотрофных микроорганизмов потребо-

вался фермент, эффективно использующий NAD⁺, а не NADP⁺. Первым этапом эволюционного процесса было появление остатка Asp в положении 221, обеспечивавшего NAD⁺-специфичность. ФДГ бактерий *Pseudomonas* sp. 101, по-видимому, и является продуктом этого этапа эволюции. Этот фермент уже имеет остаток Asp, ответственный за специфичность к NAD⁺, но при этом в качестве «рудиментов» содержит положительно заряженный остаток Arg222, участвующий в связывании NADP⁺, а также Ala в положении 198. ФДГ метилотрофных дрожжей появились на более поздних этапах эволюции. Эти ферменты потеряли указанные «рудиментарные» остатки, они обладают абсолютной специфичностью к NAD⁺ (табл. 2). В ходе эволюции в дрожжевых формиатдегидрогеназах также произошла замена «неканонического» остатка Ala в положении 198 на «канонический» Gly, а остаток, соответствующий по положению Arg222 в PseFDH, – на остаток Tyr, что наглядно показано в наших экспериментах по изменению коферментной специфичности от NAD⁺ к NADP⁺ у ФДГ из пекарских дрожжей [18]. Более подробно эксперименты по изменению коферментной специфичности PseFDH описаны в работе [7]. ●

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2304.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wierenga R.W., Hol W.G.J. // Nature. 1983. V. 302. № 5911. P. 842–844.
2. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. № 3. P. 759–785.
3. Филиппова Е.В., Поляков К.М., Тихонова Т.В., Стеханова Т.Н., Бойко К.М., Садыхов Э.Г., Тишков В.И., Попов В.О. // Кристаллография. 2006. Т. 51. № 4. С. 663–667. (Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Stekhanova T.N., Boiko K.M., Sadykhov E.G., Tishkov V.I., Popov, V.O., Labrou, N. // Crystallography Reports. 2006. V. 51. № 4. P. 627–631.)
4. Shabalin I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. V. 65. № 12. P. 1315–1325.
5. Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 3. P. 89–93.
6. Маторин А.Д. Механизм субстратной и коферментативной специфичности бактериальной формиатдегидрогеназы: Дис. ... канд. хим. наук. М: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2000. 127 с.
7. Alekseeva A.A., Dolina I.A., Zarubina S.A., Matorin A.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // Biochimie. 2015. submitted for publication.
8. 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.
9. Rao S.T., Rossmann M.G. // J. Mol. Biol. 1973. V. 76. № 2. P. 241–256.
10. Lesk A.M. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. № 6. P. 775–783.
11. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. № 1. P. 89–110.
12. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2012. 510 p.
13. Серов А.Е., Одинцева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 7. С. 974–979 (Serov A.E., Odintzeva E.R., Uporov I.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2005. V. 70. № 4. P. 804–808.)
14. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537–1554. (Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. № 11. P. 1252–1267.)
15. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // Enz. Microbial Technol. 2010. V. 46. № 7. P. 557–561.
16. Gul-Karaguler N., Sessions R.B., Clarke A.R., Holbrook J.J. // Biotechnol. Lett. 2001. V. 23. № 4. P. 283–287.
17. Andreadeli A., Platis D., Tishkov V., Popov V., Labrou N.E. // FEBS J. 2008. V. 275. № 15. P. 3859–3869.
18. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // Biochem. J. 2002. V. 367. № 3. P. 841–847.
19. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Biochimie. 1989. V. 71. № 4. P. 551–557.
20. Серов А.Е., Попова А.С., Тишков В.И. // ДАН. 2002. Т. 382. № 3. С. 401–405. (Serov A.E., Popova A.S., Tishkov V.I. // Dokl. Biochem. Biophys. 2002. V. 382. № 1–3. P. 26–30.)

УДК 57.083.3; 611.018.7; 611.08

Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи

О. С. Роговая^{1,2*}, А. К. Файзулин³, А. В. Васильев¹, А. В. Кононов⁴, В. В. Терских¹¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1³Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы, 119049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9⁴Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20, стр.1

*E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Поступила в редакцию 24.06.2014

РЕФЕРАТ Живой эквивалент кожи (ЖЭК) исследован в качестве альтернативного источника пластического материала для закрытия полнослойных эпителиостромальных повреждений уретры. На примере восстановления уретры лабораторных кроликов изучена возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели *in vivo*. Результаты серии аутологичных трансплантаций живого эквивалента кожи в деэпителизованную уретру показали, что кератиноциты кожи, помещенные в специфичное микроокружение *in vivo*, способны встраиваться в место дефекта и выполнять функции уротелия. Для трансплантации использовали кератиноциты, трансфицированные EGFP, что позволило идентифицировать пересаженные клетки. Реконструировано строение уретральной трубки без образования стриктур и свищей в месте трансплантации живого эквивалента кожи. Иммуногистохимически в структуре неоуретры выявлены EGFP-положительные клетки, экспрессирующие маркеры уротелия (K7 и UP3).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кератиноциты, пластичность эпителия, стволовые клетки эпидермиса, трансдифференцировка, тканевая инженерия, уротелий.

ВВЕДЕНИЕ

Складывающаяся сегодня концепция клеточных механизмов регенерации предполагает, что характер и механизмы регенерации определяются типами вовлеченных в процесс тканеспецифичных стволовых и ранних прогениторных клеток [1–3]. К настоящему моменту накопилось значительное количество данных, согласно которым в определенных условиях тканеспецифичные стволовые клетки могут проявлять значительную фенотипическую пластичность, что позволяет говорить о возможности трансдифференцировки этих клеток. Сегодня феномен трансдифференцировки показан в некоторых моделях, в том числе и в моделях восстановления эпителиальных тканей рога, мочевого пузыря, кишечника и др. [4, 5]. Мы предполагаем, что феномен пластичности может быть использован в тканевой инженерии и клеточных технологиях как подход к получению клеток и клеточных конструкций, необходимых для восстановления структур и/или функций тка-

ней и органов. Развитие данного направления регенеративной медицины позволит решить такую актуальную проблему, как дефицит собственных тканей пациента, который на сегодняшний день считается причиной значительного количества неудач реконструктивных операций [6, 7]. Не менее значима и проблема разработки гистотипических тканевых конструкций *in vitro*, пригодных для моделирования морфогенетических процессов, в том числе и с участием стволовых тканеспецифичных клеток [8–11].

Помимо прямого встраивания в структуру поврежденной ткани возможно и индукционное участие стволовых клеток и клеточных конструкций в процессах регенерации и репарации [12, 13]. Такое индуцирующее влияние может быть различным по интенсивности и специфичности. Именно индукционным влиянием можно объяснить восстановление тканей после трансплантаций аллогенных тканеинженерных гистотипических конструкций, содержащих стволовые/прогениторные клетки.

С учетом изложенного в представленной работе изучена возможность использования живого эквивалента кожи в качестве альтернативного источника пластического материала для закрытия полнослойных эпителиостромальных повреждений уретры. На примере восстановления уретры лабораторных кроликов исследована возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на 20 самцах кроликов породы шиншилла весом не более 2 кг. Все процедуры проводили согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике ИБР РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики». В экспериментальной группе было 14 животных, в контрольной – шесть.

Выделение и культивирование кератиноцитов кролика

Всем подопытным животным перед началом эксперимента присваивали порядковый номер. Бирку с номером прикрепляли к клетке, в которой на протяжении всей работы содержали кролика. Номер вносили в лабораторный журнал, и в дальнейшем присваивали его полученной из этого кролика культуре кератиноцитов.

При первой операции у животных производили забор кожи с внутренней стороны уха, причем толщина биоптата составляла около 0,3 мм.

Сразу после отделения лоскут кожи помещали в среду M199 с 10-кратным содержанием 0,4 мг/мл гентамицина. В случае необходимости кусочки кожи хранили в течение 24 ч при +4°C. Всю работу проводили в стерильных условиях. Перед процедурой хранения образцы кожи тщательно промывали в растворе Хенкса и помещали в среду M199 или Игла с антибиотиками. Перед выделением клеток биоптаты промывали раствором Хенкса с гентамицином (0,4 мг/мл) или 2000 ед./мл пенициллина и 1 мг/мл стрептомицина. Лоскуты кожи разрезали на полоски шириной 3 × 10 мм, промывали PBS, помещали в 0,125% раствор диспазы (Sigma) и инкубировали при 4°C в течение 16–24 ч или в 2% растворе диспазы в течение 1 ч при 37°C. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. Кусочки эпидермиса, отделенные от подлежащей дермы, промывали в PBS и помещали в раствор PBS + 0,25% трипсин (1 : 1). Инкубировали при 36°C в течение 10–15 мин, после чего трипсин ингибировали раствором сыворотки крупного рогатого скота или лошадиной и пипетированием получали суспен-

зию эпидермальных кератиноцитов кролика, которую фильтровали через 100-мкм нейлоновое сито и осаждали центрифугированием при 100 *g* в течение 10 мин. Затем супернатант сливали и суспендировали осадок в среде для культивирования кератиноцитов. Высеивали суспензию кератиноцитов в пластиковые культуральные флаконы Costar, предварительно сорбированные раствором коллагена, в концентрации 200000 клеток/мл.

Для сорбции поверхности культуральных флаконов использовали жидкий (0,1 мг/мл) раствор коллагена типа 1 в 0,1% уксусной кислоте. Процедуру проводили следующим образом: на дно флакона площадью 25 см² наливали 2–3 мл раствора коллагена и оставляли при 37°C на 20 мин, после чего коллаген сливали и тщательно промывали флакон раствором Хенкса с феноловым красным до исчезновения кислой реакции.

Первые 3 сут кератиноциты кролика культивировали в среде DMEM/F-12 (2 : 1) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 5 мкг/мл инсулина (Sigma), 10⁻⁶ М изопротеренола (Sigma), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma). После этого культуру клеток переводили на среду DMEM/F-12 (2 : 1) с 5% ЭТС, 10 нг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР) с суммой остальных добавок (см. выше) и культивировали при регулярной смене среды в CO₂-инкубаторе.

Дестратификация пластов культуры кератиноцитов

Дестратификацию (стриппинг) культуры кератиноцитов производили после формирования клетками многослойного пласта, для чего заменяли среду в культуральных флаконах средой КВЕ без Ca²⁺ и оставляли на 1–3 сут до полного отслоения всех слоев клеток, кроме базального. После проведения стриппинга культуру кератиноцитов переводили на нормальную среду для культивирования и спустя 1 сут пересевали на поверхность живого дермального эквивалента. Пересевали кератиноциты, снимая их с поверхности культуральных флаконов, при помощи раствора трипсина/ Версена (1 : 1).

Приготовление живого эквивалента кожи на основе аутологичных кератиноцитов и фибробластов кролика для трансплантации в дефект уретры

В стерильных условиях вскрывали упаковку губки Spongostan, ножницами вырезали кусок, по размеру и форме соответствующий размеру чашки Петри, и однократно промывали его раствором Хенкса. Затем готовили коллагеновый гель с постнатальными фибробластами кролика или человека в концентрации 25–30 тысяч клеток /мл геля, как описано выше,

и заливали в чашки Петри со спонгостаном. На чашку Петри Ø 3.5 см вливали 1.5 мл геля.

Фибробласты в коллагеновом геле культивировали на поверхности губки в течение 1 сут в CO₂-инкубаторе. Затем, используя данную конструкцию как эквивалент соединительной ткани, готовили живой эквивалент кожи с фибробластами в коллагеновом геле и кератиноцитами кожи кролика на его поверхности по стандартному протоколу, описанному выше. Чтобы соблюсти принцип аутологичной трансплантации в дальнейшем на всех этапах на посуду с культурой кератиноцитов и с живым эквивалентом кожи наклеивали этикетку с номером, присвоенным подопытному животному.

Мечение клеток трейсером

На начальном этапе работы для мечения аутологичных кератиноцитов использовали 0.00001% раствор мембранного трейсера DiI в культуральной среде без сыворотки, в котором в течение 1 ч инкубировали готовые к трансплантации клетки.

Лентивирусная трансфекция культуры кератиноцитов

Трансфекцию клеток улучшенным флуоресцентным зеленым белком (EGFP) проводили с использованием лентивирусной конструкции производства «Евроген» (вирус поставляется в среде DMEM в количестве 1.5×10^6 вирусных частиц/мл). Трансфекцию проводили, внося рекомендованное производителем количество – 10 копий вируса на 1 клетку.

Для проведения трансфекции 1.5×10^5 кератиноцитов высевали в чашку Петри (Ø 3.5 см), после полного прикрепления клеток питательную среду в чашке заменяли на среду DMEM, содержащую вирус. Одновременно для повышения проницаемости клеточной мембраны добавляли полибрен в концентрации 5 мг/мл и инкубировали таким образом в течение 1 сут. После трансфекции клетки переводили на стандартную среду культивирования. Через 72 ч наблюдали экспрессию EGFP.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление парафиновых срезов

В качестве фиксатора использовали 4% параформальдегид на PBS (рН 7.4). Ткань фиксировали в течение 1 сут, затем промывали PBS. Ткань обезживали, проводя ее через серию спиртов по стандартному протоколу. Дальнейшую гистологическую проводку осуществляли с использованием ксилола. Далее образцы помещали в парафин. Срезы из парафиновых блоков изготавливали с использованием микротомы MICROM фирмы Carl Zeiss. Готовили се-

рийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые наносили на стекла. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Приготовление криосрезов

Кусочки ткани размером не более 0.5×1.0 см фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 4% растворе параформальдегида, промывали материал PBS и помещали в 20% раствор сахарозы для пропитки на 8–12 ч до полного погружения. Подготовленный таким образом материал замораживали в парах азота и хранили при -70°C . Срезы толщиной 15–20 мкм получали на криостате Leica DM IL (ФРГ).

Иммуногистохимические исследования препаратов

Экспрессию различных белков определяли с использованием моноклональных антител для выявления кератинов кожи K14 и уротелия K7 и K18 (NovoCastra), UP3 (UsBioLogical) и EGFP («Евроген»). Использовали иммунофлуоресцентный метод выявления антигенов.

При иммунофлуоресцентном методе применяли следующий протокол окраски: первичные антитела разводили на блокирующем растворе (5% бычьего сывороточного альбумина + 0.1% тритона X-100 на PBS) в концентрациях, рекомендованных производителями антител, и наносили на промытые 0.1% раствором PBS срезы. Инкубацию проводили в течение 12–16 ч при $+4^\circ\text{C}$. После этого 4–5 раз промывали материал в 0.1% PBS и инкубировали в растворе вторых антител Alexa-488 (Molecular probes) в PBS в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре. Для приготовления временных препаратов образцы заключали в глицерин.

Методика реконструкции экспериментального дефекта уретры кролика

Операцию проводили под общей анестезией по методу, описанному выше. Параллельно использовали новокаиновую блокаду полового члена, вводя по 0.5 мл новокаина в область оперативного вмешательства. Операцию начинали с окаймляющего разреза вокруг головки полового члена с переходом на продольный разрез кожи по вентральной поверхности полового члена до его основания. Кожу ствола полового члена мобилизовали до основания, рассекали мышцу по вентральной стороне до просвета уретры. После этого при помощи пинцетов отделяли эпителиальную выстилку уретры по базальной мембране на протяжении 1–1.5 см до предстательного отдела в основании полового члена кролика. Живой эквивалент кожи на коллагеновой основе прямоугольной формы, равный по длине дефекту уретральной трубки, а по

ширине – длине окружности создаваемой уретры, сшивали в трубку (рис. 1). Далее на катетере накладывали анастомоз проксимального отдела уретры с остатками уротелия, сшивая его с полученной трубкой, которую располагали в дистальном деэпителизованном отделе уретры методом «конец в конец» и с вершиной головки полового члена. В заключение ушивали раневой дефект местными тканями. Уретральный катетер № 8 Ch подшивали к коже головки полового члена атравматической нитью PDS 5/0. Операция завершалась наложением компрессионной повязки с глицерином. На 7-е сут удаляли уретральный катетер.

Реактивы и растворы, использованные в работе

Среда M199^{x10}, среда DMEM /F-12, раствор Хенкса, раствор Версена, PBS (ООО «ПанЭко»), эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (HyClon США); эпидермальный фактор роста (ЭФР) (Sigma), инсулин (Sigma), изопротеренол (Sigma), гидрокортизон (Sigma), трансферрин (ООО «ПанЭко»), HEPES (Sigma), антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин («Ферейн», Москва), мембранный трейсер DiI Red (Sigma), лентивирусная конструкция с *e-gfp* (ООО «Евроген», Москва); раствор трипсина (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), диспаза (Sigma); культуральная пластиковая посуда (Costar, США), губка медицинская желатиновая Spongostan (Johnson & Johnson, США). Микроскопирование проводили на инвертированном микроскопе Leica DM IL (ФРГ) и микроскопе проводящего света Kaуensa (Япония).

Специфические антитела к кератинам клеток базального слоя эпидермиса K14 и дифференцировочным маркерам уротелия K7 и K18 (NovoCastra) и уроплакин 3 (UP3) (UsBioLogical).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с изучением пластичности кератиноцитов живые эквиваленты кожи (ЖЭК) трансплантировали в деэпителизованную уретру лабораторным кроликам, а затем анализировали их поведение в новом микроокружении. Одно из основных условий возможности встраивания трансплантата в область повреждения – отсутствие реакции «трансплантат против хозяина», что и определило выбор для пересадки аутологичных клеток кожи.

На первом этапе работы была разработана модель трансплантации ЖЭК в деэпителизованную уретру кролика (см. «Экспериментальную часть»). Через 3 недели после трансплантации животные, перенесшие операцию, были способны к самостоятельному мочеиспусканию, что свидетельствует о восстановлении функции уротелия.

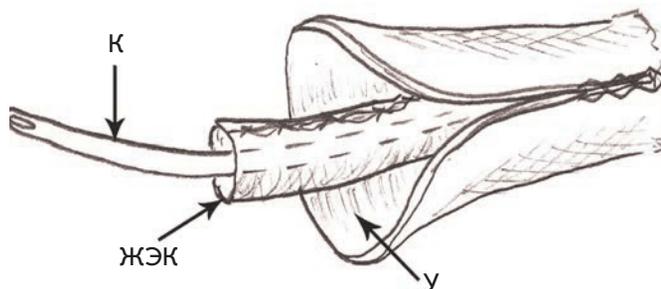


Рис. 1. Схема трансплантации живого эквивалента кожи (ЖЭК) в деэпителизованную уретру (У). К – мочеотводящий катетер

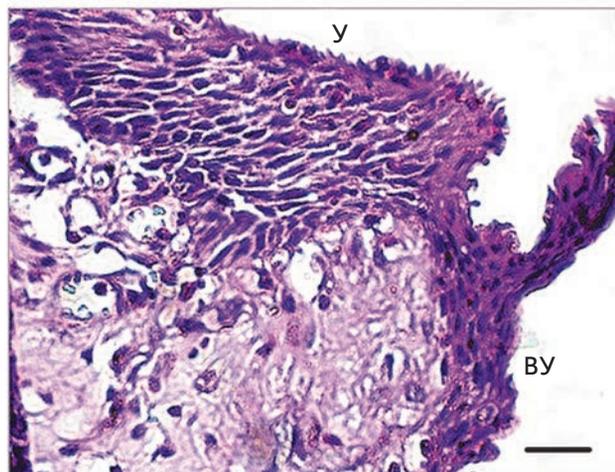


Рис. 2. Поперечный срез восстановленного участка уретры кролика, 21 сут после трансплантации. Место анастомоза участков собственной уретры (У) (верхний отдел) и восстановленной уретры (ВУ). Окраска гематоксилином-эозином, размер линейки 20 мкм

Эпителий восстановленной уретры значительно отличался от нормального уротелия: по своей морфологии он соответствовал плоскому многослойному эпителию (рис. 2). Данный факт можно объяснить тем, что в качестве источника кератиноцитов для создания живого эквивалента кожи использовали эпителий кожи уха кролика, при этом неэпителий выполнял функции уротелия (свободное мочеиспускание, отсутствие свищей). В связи с тем, что цель первого эксперимента состояла в принци-

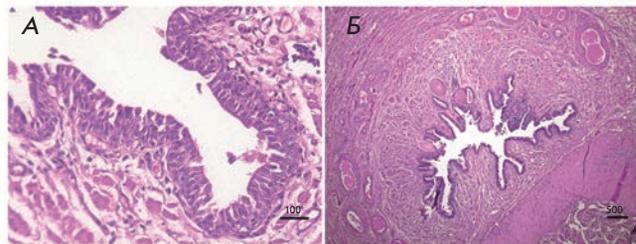


Рис. 3. Поперечный срез восстановленной уретры кролика через 45 сут после трансплантации, окраска гематоксилином-эозином (участок восстановленный уретры (А), восстановленная уретра, поперечный срез, общий вид при $\times 40$ (Б))

пиальной отработке технологии подготовки трансплантата и методики операции, за поведением трансплантата наблюдали в течение 21 сут.

В дальнейшем мы использовали для трансплантаций живой эквивалент кожи с мечеными кератиноцитами, которые можно было выявлять в уретре. Эксперименты проведены на 17 половозрелых кроликах (6–12 месяцев). В качестве контроля использовали две группы животных: одна группа состояла из трех животных с деэпителизированной уретрой без трансплантации живого эквивалента кожи, вторая – из трех животных, которым в качестве трансплантата пересаживали желатиновую губку спонгостан без клеток. Подопытная группа состояла из 11 животных, которым трансплантировали живой эквивалент кожи с мечеными клетками. У всех животных контрольных групп в течение 2 недель после операции наблюдались осложнения в виде свищей и сильная воспалительная реакция. После удаления катетера, четыре из шести контрольных животных не были способны к самостоятельному мочеиспусканию. В связи с этим животные контрольной группы были усыплены в течение 2 недель после начала эксперимента. Все кролики подопытной группы были способны к самостоятельному мочеиспусканию уже спустя 4–7 дней после трансплантации живого эквивалента кожи. Стриктур и сужений уретральной трубки не выявлено.

Перед трансплантацией аутологичные клетки метили мембранным трейсером DiI. Полученную конструкцию имплантировали на место созданного уретрального дефекта семи подопытным кроликам. Результат оценивали через 14, 30, 45 сут и 3 месяца после имплантации.

Через 14 сут после имплантации живого эквивалента кожи уретерий у животных не был полностью восстановлен. Выявлены небольшие участки эпителизации и скопления клеток, содержащих метку DiI и положительных по K14 – маркеру базальных кера-

тиноцитов эпидермиса кожи. Клеток, положительных по K18 и K7 (маркеры уретерия), не обнаружено.

Через 30 сут после трансплантации мы наблюдали на гистологических срезах восстановленный эпителий, представленный одним–тремя слоями клеток. Практически все его клетки содержали мембранный трейсер и окрашивались на дифференцировочный маркер уретерия K7 и маркер базальных кератиноцитов эпидермиса K14. Кератин 18 на данных сроках в восстановленном уретерии не экспрессировался.

Через 45 сут после трансплантации у кроликов происходило полное восстановление уретерия, представленного многослойным переходным эпителием (рис. 3). На препаратах выявлено некоторое количество клеток, содержащих метку. Мембранный трейсер, использованный в данном эксперименте в качестве метки, имеет объективные ограничения в сроках обнаружения в клетках, так как он разбавляется при каждом клеточном делении. Все клетки восстановленного уретерия экспрессировали в эти сроки K18 и K7. Присутствие в клетках K14 слабо проявлялось. Таким образом, по экспрессии кератинов на данных сроках восстановленный эпителий уретры соответствовал нормальному уретерии у кроликов. Полученные результаты позволили нам сделать вывод о том, что аутологичные кератиноциты кожи, выращенные в составе живого эквивалента кожи, могут сохраняться в уретре кролика в течение 1.5 месяцев после трансплантации. Трансплантация ЖЭК позволяет восстановить структуру и функцию уретерия. В отличие от Atala [14], который в качестве источника клеток использовал биопсию мочевого пузыря, мы применяли аутологичные эпидермальные кератиноциты, так как получение аутологичных клеток эпителия мочевыводящих путей приводит к значительному расширению оперативного поля (биопсия мочевого пузыря). Данная технология позволяет решить проблему дефицита пластического материала. Кроме того, это позволяет избежать использования для уретропластики кожи, содержащей волосяные фолликулы, которая часто применяется хирургами в настоящее время.

При использовании в трансплантате аутологичных клеток эпидермиса возможно их встраивание в место дефекта. При этом замещение недостающих тканей может происходить за счет компартамента стволовых и транзиторных клеток, входящих в состав эквивалента. Lehrer и соавт. [15] установили, что в эпидермисе регенерация идет в основном за счет компартамента стволовых клеток базального слоя, а также в значительной степени за счет транзиторных клеток. При этом скорость созревания базальных клеток и их дифференцировка может сокращаться. Li и соавт. [16] показали, что в реконструкции эпидермиса

после трансплантации кератиноцитов, выращенных в культуре пластов, принимали участие не только стволовые клетки, но и часть транзиторных клеток, причем даже некоторые, уже коммитированные к дифференцировке. Полученные нами результаты и анализ опубликованных данных позволяют предполагать, что стволовые и транзиторные клетки эпидермиса, присутствующие в живом эквиваленте кожи, попадая в микроокружение уротелия, не только выполняют его функцию, но и проявляют феномен пластичности, обладая свойствами клеток уротелия.

С целью отслеживания расширения клеточных клонов в организме животного и наблюдения за проявлениями фенотипической пластичности под влиянием микроокружения мы получили культуры эпидермальных кератиноцитов кожи от четырех лабораторных кроликов и трансфицировали их *e-GFP* при помощи лентивирусной конструкции. Через 1 неделю после трансфекции 90% клеток содержали GFP и интенсивно светились в зеленом спектре. Трансфицированные кератиноциты использовали при создании ЖЭК и культивировали в течение 1 недели.

Полученный таким образом трансплантат с аутологичными клетками использовали в создании неоуретры у кроликов по методике, описанной выше. Через 21, 45 и 90 сут после трансплантации проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Для усиления сигнала EGFP мы использовали антитела к EGFP. Кроме того, препараты были окрашены антителами к кератинам 14 и 7, а также к уроплакнину 3 (UP3) – маркеру дифференцировки уротелия.

Через 21 сут после трансплантации мы обнаружили в уретре кролика формирующийся эпителий, состоящий из одного–четырех слоев клеток. Иммуногистохимическое выявление EGFP дало положительный результат. Это, вероятнее всего, говорит о том, что мы обнаружили в просвете уретральной трубки прижившиеся кератиноциты кожи, содержащие EGFP. Присутствие UP3 в восстановленном уротелии на данном сроке не обнаружено.

Через 45 сут после трансплантации эпителий уретры был представлен переходным эпителием, состоящим из трех–семи слоев клеток. Меченные EGFP клетки были найдены во всех слоях эпителия уретры (рис. 4), часть которых экспрессируют кератин 14 (рис. 4А,Б).

В то же время обнаружены другие маркеры уротелия, К7 и UP3. Причем, изучив распределение данных маркеров и экспрессию EGFP в клетках неоуретры при большом увеличении, можно с уверенностью говорить о колокализации зеленого белка и маркеров дифференцированных клеток уротелия (рис. 4В–Е).

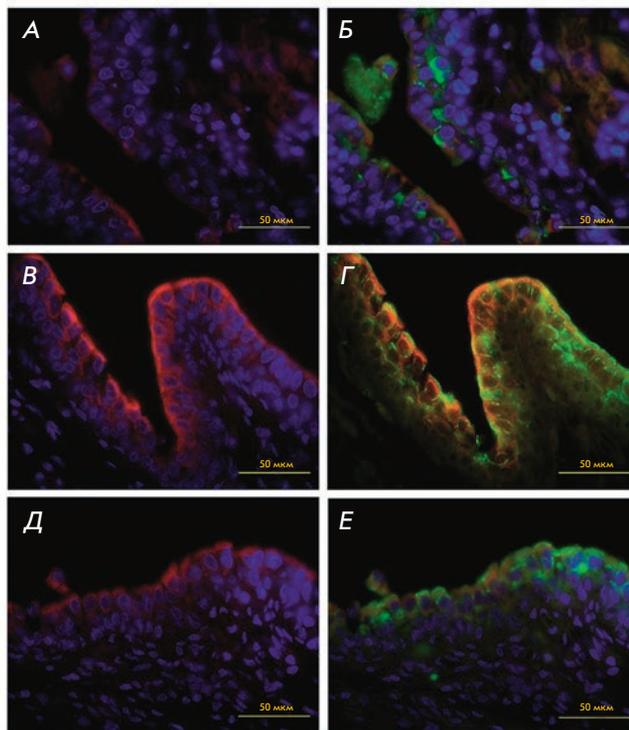


Рис. 4. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 45 сут после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Обнаружена колокализация генетической метки EGFP (на Б, Г и Е – зеленый) и маркеров уротелия – К14 (красное окрашивание на А и Б, К7 (красное окрашивание на В и Г) и UP3 (красное окрашивание на Д и Е). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание)

Через 3 месяца после трансплантации в препаратах восстановленного уротелия нами был обнаружен полностью сформированный уротелий нормального строения, большая часть клеток верхнего слоя которого экспрессировала UP3 (рис. 5). Также обнаружены группы клеток, содержащие EGFP (рис. 5, 6). Такое расположение содержащих метку клеток можно объяснить тем, что скорость регенерации у животных, в частности у кроликов, довольно высокая, и краевая миграция клеток уротелия из верхнего отдела уретры, а также пролиферация единичных клеток уротелия, вероятно оставшихся в месте создания дефекта, проходила параллельно разрастанию островков эпителизации трансплантированных кератиноцитов. Как и в предыдущих экспериментах, на данных сроках все слои неоуретелия экспрессировали кератин 7 (рис. 6).

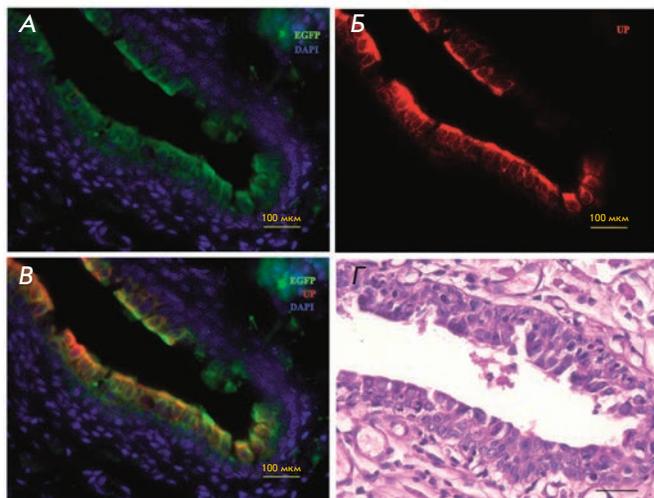


Рис. 5. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 3 месяца после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Колокализация генетической метки EGFP (на А и В – зеленое окрашивание) и маркера уротелия UP3 (на Б и В – красное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание). Г – окраска гематоксилином-эозином

В экспериментах с трансплантацией аутологичных EGFP-содержащих кератиноцитов кожи кролика в уретральную трубку было показано, что через 3 месяца после трансплантации в уретру кератиноциты кожи полностью восстанавливают уротелий. Под влиянием специфического микроокружения уретры клетки меняли свой фенотип, приобретая такие признаки, как наличие кератина 7 и UP3.

Таким образом, при трансплантации в область дефекта уротелия аутологичные кератиноциты кожи встраиваются в структуру уретры, восстанавливая ее целостность, и под воздействием специфического микроокружения приобретают фенотипические признаки клеток уротелия.

Полученные данные позволяют нам предположить, что кератиноциты кожи взрослого организма, выращенные *in vitro* и трансплантированные в уретру, проявляют способность к пластичности. Это предположение согласуется с данными о пластичности взрослых стволовых/прогениторных клеток. В частности, обнаружено, что эпидермальные кератиноциты проявляют способность к пластичности в определенных условиях: под влиянием мезодермы семенных пузырьков новорожденных крысят в дифференцированных клетках уротелия взрослого человека начинается экспрессия новых неспецифических маркеров функциональной и морфологической

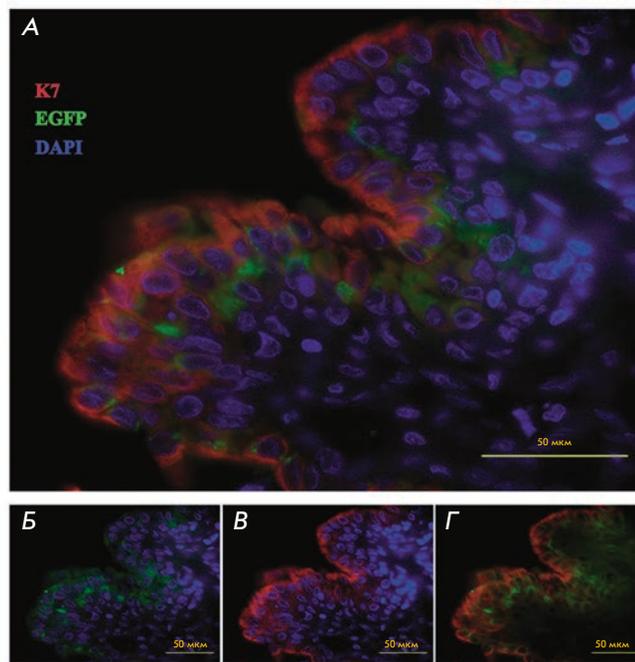


Рис. 6. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 3 месяца после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Колокализация генетической метки EGFP (на А, Б и Г – зеленое окрашивание) и маркера уротелия K7 (А, В и Г – красное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание)

дифференцировки [17]. Есть данные, показывающие, что клетки роговицы способны трансдифференцироваться в клетки эпидермиса под воздействием сигналов эмбриональной дермы [18]. Пластичность эпидермальных кератиноцитов наблюдали и в экспериментах по трансплантации клеток в роговицу. В работе [5] авторы так же исследовали изменения фенотипа генетически меченных клеток и наблюдали эффект трансдифференцировки, заключающийся в том, что профиль экспрессии эпидермальных кератиноцитов изменялся с K14 на K3/12, характерный для эпителия роговицы.

Сигналы, производимые микроокружением, определяют поведение и свойства стволовых клеток. В частности, сигналы мезенхимы играют важнейшую роль в поддержании их статуса. Ferraris и соавт. использовали межвидовые перекрестные трансплантации [19] и обнаружили, что при трансплантации под капсулу почки сигналы из эмбриональной дермы мыши могут распознаваться эпителием роговицы взрослого кролика. При этом эпителий роговицы трансдифференцируется в эпидермис, содержа-

щий волосяные фолликулы. Влияние уротелиоцитов на фенотип трансплантированных кератиноцитов кожи также является немаловажным фактором, влияющим на направление их дифференцировки. В частности, такой эффект описан для клеток *in vitro*: при культивировании кератиноцитов волосяного фолликула на среде, кондиционированной уротелиоцитами клетки кожи, уже через 2 недели переставали экспрессировать K15, в то же время в них начиналась экспрессия всех кератинов 7 и 18, характерных для эпителия уретры [20].

Полученные результаты имеют не только фундаментальный, но и практический интерес. Дефицит пластического материала приводит к ряду проблем в реконструктивной хирургии мочеполовой системы. В работе Atala [14] описан метод создания уретры *de novo* с использованием клеток мочевого пузыря, выращенных на коллагеновой подложке. Успешность подобных операций позволяет утверждать, что тканеинженерные подходы к реконструкции уретры весьма перспективны. Однако недостатком данного метода является дефицит исходного пластического материала и травматичная процедура по забору биоптата из полости мочевого пузыря. Использование кожи (например, кожи мошонки) как легкодоступного пластического материала для создания искусственного мочеиспускательного канала за многие годы подобных операций показало, что клетки кожи способны приживаться в условиях агрессивной среды (влияние мочи) и брать на себя функции уротелия

[21, 22]. Однако данный метод может приводить к таким осложнениям, как рост волос в просвет уретры в период полового созревания. Предлагаемая нами конструкция создана из кератиноцитов, прошедших стадию культивирования, и не образует волосяных фолликулов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Нами разработана методика восстановления уретры с использованием коллагеновой подложки и клеток кожи, прошедших стадию культивирования. В таком эквиваленте уретры отсутствуют волосяные фолликулы, и одновременно решается проблема дефицита пластического материала. Аутологичные кератиноциты кожи, помещенные в микроокружение, специфичное для уротелия, проявляют фенотипическую и функциональную пластичность, принимая на себя функции уротелия.

Трансплантация живого эквивалента кожи с аутологичными кератиноцитами кожи в эпителиальный дефект уретральной трубки кроликов приводит к полному восстановлению структуры уротелия и функции уретры.

После трансплантации кролику в дефект уретры живого эквивалента кожи аутологичные эпидермальные кератиноциты меняют свой фенотип и приобретают признаки (синтез K7 и UP3), характерные для эпителия уретры, что свидетельствует о пластичности взрослых эпидермальных стволовых клеток. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Phinney D.G., Prockop D.J. // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 11. P. 2896–2902.
- Bais M.V., Shabin Z.M., Young M., Einhorn T.A., Kotton D.N., Gerstnefeld L.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 417. № 1. P. 211–216.
- Baker R.E., Murray P.J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. № 6. P. 607–612.
- De Coppi P., Callegari A., Chiavegato A., Gasparotto L., Piccoli M., Taiani J., Pozzobon M., Boldrin L., Okabe M., Cozzi E., et al. // *J. Urol.* 2007. V. 177. № 1. P. 369–376.
- Meyer-Blazejewski E.A., Call M.K., Yamanaka O., Liu H., Schlötzer-Schrehardt U., Kruse F.E., Kao W.W. // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 1. P. 57–66.
- Mhashilkar A., Atala A. // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2012. V. 7. № 1. P. 1.
- Fisher M.B., Mauck R.L. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2013. V. 19. № 1. P. 1–13.
- Grinnell F. // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. № 9. P. 362–365.
- Palmiero C., Imperato G., Urciuolo F., Netti P. // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. № 7. P. 2548–2553.
- Tuan R.S. // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2011. V. 26. P. 50–62.
- Peterbauer-Scherb A.I., Danzer M., Gabriel C., van Griensven M., Redl H., Wolbank S. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. V. 6. № 6. P. 434–442.
- Васильев А.В., Воротеяк Е.А., Киселев И.В., Терских В.В. // *Вестн. Рос. акад. мед. наук*. 2008. № 2. С. 45–53.
- Kim J.H., Kong W.H., Kim J.G., Kim H.J., Seo S.W. // *Artif. Organs*. 2011. V. 35. № 2. P. 122–130.
- Atala A. // *J. Endourol.* 2000. V. 14. № 1. P. 49–57.
- Lehrer M.S., Sun T.-T., Lavker R.M. // *J. Cell Sci.* 1988. V. 111. P. 2867–2875.
- Li A., Pouliot N., Redvers R., Kaur P. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 113. P. 390–400.
- Aboseif S., El-Sakka A., Young P., Cunha G. // *Differentiation*. 1999. V. 65. P. 113–118.
- Peartson D.J., Yang Y., Dhouailly D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 3714–3719.
- Ferraris C., Chevalier G., Favier B., Jahoda C.A., Dhouailly D. // *Development*. 2000. V. 127. № 24. P. 5487–5495.
- Drewa T., Joachimiak R., Bajek A., Gagat M., Grzanka A., Bodnar M., Marszałek A., Dębski R., Chłosta P. // *Int. J. Urol.* 2013. V. 20. № 5. P. 537–542.
- Файзулин А.К., Коварский С.Л. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2002. № 2. С. 84–85.
- Файзулин А.К., Демин Н.В. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2009. № 4. С. 31–35.

УДК 577.151.45:578.287

Сравнительный анализ влияния мутаций лекарственной устойчивости на активность интеграз ВИЧ-1 субтипов А и В

О. А. Шадрина¹, Т. С. Зацепин^{2,3}, Ю. Ю. Агапкина³, М. Г. Исагулянц^{4,5}, М. Б. Готтих^{2,3*}

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

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

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

⁴Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

⁵Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Nobels väg 16, 17177, Stockholm, Sweden

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

Поступила в редакцию 22.10.2014

РЕФЕРАТ Интеграция ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в геном зараженной клетки – одна из ключевых стадий репликативного цикла этого вируса. Катализирующий ее вирусный фермент интегразы служит важной мишенью для новых противовирусных препаратов. Однако при проведении антиретровирусной терапии в гене интегразы возникают мутации, вызывающие резистентность вируса к ингибиторам интеграции. Для оценки влияния мутаций лекарственной устойчивости на активность интегразы ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU-A, доминирующего на территории России, получены и охарактеризованы препараты консенсусной интегразы этого субтипа вируса, содержащие первичные мутации лекарственной устойчивости G118R и Q148K и вторичные компенсаторные замены E138K и G140S, и проведено их сравнение с соответствующими мутантными формами интегразы ВИЧ-1 субтипа В штамма HXB-2. Мутация Q148K практически одинаково снижала активность интеграз обоих субтипов. Ее негативный эффект частично компенсировался вторичными мутациями E138K и G140S. Первичная замена G118R по-разному влияла на активность белков субтипов А и В, компенсаторное действие вторичной замены E138K также зависело от субтипа вируса. Сравнение устойчивости всех мутантов к известным ингибиторам переноса цепи ралтегравир и элвитегравир и новому ингибитору XZ-259 из класса дигидро-1Н-изоиндолов показало, что белки обоих субтипов с мутацией Q148K малочувствительны к ралтегравир и элвитегравир, но достаточно эффективно ингибируются XZ-259. Замена G118R незначительно снижала эффективность ингибирования интеграз ралтегравиром и элвитегравиром и не вызывала устойчивости к XZ-259.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1 субтипа А, интегразы, ингибитор переноса цепи, мутации лекарственной устойчивости, штамм FSU-A.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИИ – интегразы; ИИ_А – интегразы субтипа А ВИЧ-1 штамма FSU-A; ИИ_В – интегразы субтипа В ВИЧ-1 штамма HXB-2; RAL – ралтегравир; EVG – элвитегравир; DTG – долутегравир; IC₅₀ – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; FC – изменение величины IC₅₀ мутантных белков по сравнению с диким типом; wt – дикий тип интегразы; ПААГ – полиакриламидный гель; DTT – дитиотреитол; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; ТБЕ – трис-боратный буфер с EDTA.

ВВЕДЕНИЕ

Интегразы — один из основных ферментов вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), необходимых для его репликации. Она катализирует встра-

ивание ДНК-копии геномной РНК вируса в клеточную ДНК в ходе двух последовательных реакций. Первая из них – реакция 3'-процессинга – заключается в отщеплении динуклеотида GpT с 3'-конца

каждой цепи вирусной ДНК. Вторая – реакция переноса цепи – представляет собой встраивание процессированной вирусной ДНК в ДНК инфицированной клетки.

Интеграза ВИЧ-1 не имеет гомологов в клетке и в силу этого служит привлекательной мишенью для создания ингибиторов ВИЧ-инфекции. К настоящему времени три соединения – ингибиторы переноса цепи ралтегравир (RAL), элвитегравир (EVG) и долутегравир (DTG) – допущены к терапевтическому применению в качестве компонентов антиретровирусной терапии. Однако под воздействием ингибиторов интеграции как у больных, так и в культуре ВИЧ-инфицированных клеток в гене интегразы возникают мутации, вызывающие резистентность к этим препаратам [1]. К ингибиторам переноса цепи первого поколения – RAL и EVG – у вируса достаточно быстро вырабатывается устойчивость, в том числе перекрестная. Одна из общих причин высокой резистентности к обоим ингибиторам – первичная мутация по остатку Q148 [2–6]. В большинстве случаев она возникает в комбинации со вторичными мутациями, среди которых наиболее часто встречаются G140S/A и E138K/A [2–7]. Как было показано в *in vitro*- и *in vivo*-исследованиях, вторичные мутации частично восстанавливают репликативную способность вируса, сниженную первичными заменами, а также могут усиливать лекарственную устойчивость [7–11].

DTG – препарат второго поколения – активен против большинства RAL- и EVG-устойчивых штаммов вируса [9, 12, 13]. Тем не менее изучение влияния DTG на изоляты ВИЧ-1, выделенные от пациентов, нечувствительных к RAL и EVG, показало, что замены Q148H/K/R в составе интегразы приводят к некоторой резистентности к DTG. При этом вторичные и третичные мутации (G140A/C/S, L74I и E138A/K/T) дополнительно повышают эту резистентность [14, 15]. При селекции в культуре лимфоцитов штаммов ВИЧ-1, устойчивых к DTG, были отобраны варианты, содержащие целый ряд аминокислотных замен в составе интегразы: H51Y, L101I, G118R, T124A, S153F/Y, R263K [13, 16]. Однако только две из них, G118R и R263K, действительно вызывали устойчивость вируса к DTG [15, 17].

ВИЧ-1 представлен разными субтипами и рекомбинантными штаммами, среди которых территориально наиболее распространен субтип В, доминирующий на территории США, Австралии, Японии и стран Западной Европы. Мутация Q148H/R/K приводит к возникновению устойчивости к RAL и EVG у разных субтипов вируса. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к DTG, более специфичны. Так при *in vitro*-селекции резистентных

штаммов ВИЧ-1 субтипов В, С и А/Г общей для всех была только замена R263K; замена G118R обнаружена только у субтипов А/Г и С [16]. У вируса субтипа С эта мутация найдена и при *in vitro*-селекции с другим ингибитором переноса цепи второго поколения – МК-2048 [18]. В этой же работе показано, что вторичной компенсаторной заменой по отношению к G118R является мутация E138K. Недавно обнаружили, что с появлением мутации G118R связана невосприимчивость к RAL у пациента, инфицированного штаммом CRF02_A/G [19]. Крайне важно, что изолят этого вируса, содержащий замену G118R в гене интегразы, оказался резистентным не только к RAL, но и к EVG и DTG [15]. Все эти данные позволяют предположить, что замена G118R наиболее характерна для не-В-субтипов ВИЧ-1, причем ее присутствие может приводить к нечувствительности пациентов ко всем ингибиторам интегразы, разрешенным к настоящему моменту для терапевтического использования.

На территории постсоветского пространства доминирует вирус субтипа А (FSU-A), интегразы которого еще недостаточно охарактеризована [20]. В частности, еще не накоплено достаточно сведений о вызываемых ингибиторами интегразы мутациях лекарственной устойчивости, характерных для штамма FSU-A. С целью выяснения влияния возможных мутаций лекарственной устойчивости на ферментативные свойства интегразы ВИЧ-1 субтипа А мы создали консенсусную интегразу штамма FSU-A, в которую методами сайт-направленного мутагенеза вводили мутации устойчивости к RAL и EVG [21, 22]. Консенсусная последовательность интегразы ВИЧ-1 штамма FSU-A (ИН_А) отличается от последовательности наиболее изученной интегразы субтипа В (НХВ-2) заменами 16 аминокислотных остатков, девять из которых находятся в каталитическом домене. Мы охарактеризовали каталитическую активность ИН_А, а также ее вариантов, содержащих две основные комбинации мутаций, которые вызывают устойчивость к RAL и EVG: E92Q, V151I, N155H, G163R, L74M (мутант 1) и Q148K, E138K, G140S (мутант 2) [22]. Консенсусный фермент был значительно более активен, чем интегразы субтипа В (ИН_В) в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи. Введение указанных мутаций существенно повышало устойчивость ИН_А к действию RAL и EVG, но при этом значительно снижало ее каталитическую активность в обеих реакциях [22].

В настоящей работе мы продолжили исследование роли мутаций лекарственной устойчивости и провели детальное сравнение влияния первичной мутации Q148K и вторичных мутаций E138K и G140S на активность интеграз штаммов FSU-A и НХВ-2. Мы так-

же впервые охарактеризовали активность мутантов ИН_А, содержащих первичную замену G118R и компенсирующую ее замену E138K. Введение мутации Q148K резко снижало активность ферментов обоих субтипов в обеих реакциях – 3'-процессинга и переноса цепи. Это снижение несколько компенсировалось вторичными заменами E138K и G140S. Замена G118R в 5 раз уменьшала эффективность 3'-процессинга для обеих интеграз, но в реакции переноса цепи по-разному влияла на ферменты разных штаммов: активность ИН_А снижалась значительно сильнее, чем ИН_В. Более того, вторичная замена E138K оказывала компенсирующий эффект только на ИН_В. Мы также сравнили устойчивость всех полученных мутантов к RAL, EVG и новому ингибитору переноса цепи XZ-259 [23]. Препарат XZ-259 достаточно эффективно ингибировал RAL- и EVG-устойчивые формы интегразы, содержащие замену Q148K. Замена G118R привела к незначительному снижению чувствительности интеграз к RAL и EVG, более выраженному в случае ИН_В, и не влияла на чувствительность интеграз к действию ингибитора XZ-259.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты

Для экспрессии рекомбинантной ИН ВИЧ-1 обоих подтипов (дикого типа и мутантных) с гистидиновой последовательностью на N-конце использовали плазмидный вектор pET-15b (Novagen, США). Препараты белков выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta (DE3) *Escherichia coli* и очищали без добавления детергента как описано в [24]. Генетические конструкции, кодирующие мутантные формы ИН, получали с помощью сайт-направленного мутагенеза плазмиды, кодирующей исходную интегразу, с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, США). Все процедуры осуществляли согласно инструкциям производителя. Препараты анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ по Лэммли с последующим окрашиванием SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией. Чистота препаратов была не менее 90%.

Олигодезоксирибонуклеотиды

Все олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3400 (Applied Biosystems, США) согласно стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов (Glen Research, США).

Для введения радиоактивной ³²P-метки на 5'-конец олигонуклеотидов 10 пмоль олигонуклеотида инкубировали с 10 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы

(Fermentas, Литва) и 50 мкКи (16 пмоль) [γ -³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°C. Затем киназу инактивировали добавлением 2 мкл 250 мМ водного EDTA и нагреванием до 65°C в течение 10 мин. Добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида и формировали дуплекс нагреванием смеси олигонуклеотидов до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Полученный дуплекс окончательно очищали от избытка [γ -³²P]АТФ и солей на колонке MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences, США) согласно условиям производителя.

Определение каталитической активности ИН ВИЧ-1

В реакции 3'-процессинга в качестве субстрата использовали дуплекс U5B/U5A, составленный из 21-звенных олигонуклеотидов U5B (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCACAC-3') и имитирующий концевой участок U5-фрагмента длинного концевой повтора вирусной ДНК. Для анализа каталитической активности исследуемых белков 3 нМ дуплекс U5B/U5A (с ³²P-меченой U5B-цепью) инкубировали со 100 нМ интегразой в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT) при 37°C. Время инкубации варьировали от 1 до 2000 мин. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл стоп-раствора (7 мМ EDTA, 0.3 М ацетат натрия, 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.1 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт = 25 : 24 : 1, ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной в буфере ТБЕ. Радиоавтограммы получали на сканере GE Typhoon FLA 9500, денситометрию проводили с помощью программного обеспечения ImageQuant 5.0. По соотношению интенсивностей излучения полос, соответствующих субстрату U5B и укороченному на два звена продукту реакции U5B-2, определяли эффективность 3'-процессинга с использованием программы ImageQuant™ 5.0. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Gnuplot версия 4.6.

В реакции гомологичного переноса цепи в качестве субстрата и ДНК-мишени использовали ДНК-дуплекс U5B-2/U5A. Реакцию проводили в том же буфере, в котором осуществляли 3'-процессинг, используя 10 нМ дуплекс U5B-2/U5A (с ³²P-меченой цепью U5B-2) и 100 нМ интегразу, при 37°C и отбирали аликвоты через 2, 4 и 6 ч.

В реакции гетерологичного переноса цепи использовали субстрат U5B-2/U5A и 36-звенный ДНК-дуплекс (5'-АСААААТТССАТГАСААТТГТГГТ-ГГААТГССАСТА-3', 5'-ТАГТГГСАТТССАССА-СААТТГТСАТГГААТТТТГТ-3') в качестве ДНК-мишени. 2 нМ субстрат U5B-2/U5A (с ³²P-меченой цепью U5B-2) сначала инкубировали в буфере для 3'-процессинга со 100 нМ интегразой при 25°C в течение 30 мин, а затем добавляли 8 нМ ДНК-мишени и инкубировали в течение еще 2 ч при 37°C. Выделение и анализ продуктов реакции проводили как описано выше.

Ингибирование переноса цепи

Для изучения устойчивости ИН к ингибиторам RAL, EVG (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) и XZ-259 (любезно предоставлен д-ром Xue Zhi Zhao из NIH, США) реакцию гомологичного переноса цепи проводили как описано выше в течение 2 ч в присутствии возрастающих концентраций ингибитора. По результатам трех независимых опытов определяли значение IC₅₀ для каждого ингибитора. Данные по эффективности реакции аппроксимировали с помощью функции экспоненциального убывания, и вычисляли значение в точке, соответствующей 50%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью проведения сравнительного анализа влияния мутаций лекарственной устойчивости на каталитическую активность интеграз штаммов FSU-A (ИН_А) и НХВ-2 (ИН_В) методом сайт-направленного мутагенеза были получены 14 мутантных белков, по семь для каждой из интеграз: Q148K, G140S, E138K, G118R, Q148K/E138K, Q148K/G140S и G118R/E138K. Их активность определяли в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи с использованием синтетических ДНК-дуплексов, соответствующих концевой последовательности участка U5 длинного концевого повтора вирусной кДНК.

Влияние мутаций на каталитическую активность интеграз ИН_А и ИН_В в реакции 3'-процессинга

В реакции 3'-процессинга в качестве субстрата использовали 21-звенный олигонуклеотидный дуплекс (U5B/U5A), структура которого соответствовала U5-концу вирусной ДНК (U5-субстрат), и условия (концентрации фермента и ДНК, состав буфера), в которых мы ранее характеризовали каталитическую активность ИН_А и ИН_В [22].

Мы оценили зависимость эффективности 3'-процессинга от времени и построили кинетические кривые накопления продукта (рис. 1). Начальные скорости реакции 3'-процессинга (V_0) рассчитывали из линейного отрезка кривой (первые 60 мин) (табл. 1).

Как показано нами ранее [22], ИН_А активнее в реакции 3'-процессинга, чем ИН_В. Все мутанты ИН_А также характеризовались более высокой эффективностью накопления продуктов, чем соответствующие мутанты ИН_В (рис. 1). Однако начальные скорости реакции у мутантных форм обеих интеграз отличались незначительно (табл. 1).

Все введенные нами в состав интеграз обоих субтипов мутации снижали как скорость образования, так и эффективность накопления продуктов 3'-процессинга (рис. 1, табл. 1). Наиболее существенным снижением было у белков с заменой Q148K, что в случае интегразы субтипа В хорошо согласуется с ранее полученными результатами [25].

Как мы и ожидали на основании опубликованных данных [7–11, 13], замена G140S была компенсаторной для первичной мутации Q148K (рис. 1, табл. 1). Причем в случае ИН_А компенсирующее действие G140S проявлялось более сильно: изменение эффективности и начальной скорости 3'-процессинга у пары ИН_А^{G140S/Q148K}/ИН_А^{Q148K} оказалось выше, чем у соответствующей пары в субтипе В (рис. 1, табл. 1). Надо, однако, отметить, что компенсаторное действие G140S в отношении мутации Q148K, наблюдаемое для ИН_А^{Q148K} и ИН_В^{Q148K}, было не столь значительным, как в случае замены Q148N в интегразе субтипа В [8]. Очевидно, это связано с более сильным негативным влиянием на интеграционную активность исследуемой нами мутации Q148K. Различие в активности интеграз с первичными мутациями Q148K и Q148N коррелирует с различиями в интеграционной активности несущих эти мутации вирусов [7, 10, 11].

Замена E138K также оказывала компенсаторное влияние на активность интеграз обоих подтипов с первичной заменой Q148K (рис. 1, табл. 1). Однако оба двойных мутанта ИН_А^{E138K/Q148K} и ИН_В^{E138K/Q148K} были несколько менее активны, чем двойные мутанты, несущие замены G140S/Q148K. Это согласуется с уменьшением репликативной и интеграционной активности мутантных форм ВИЧ-1 субтипа В в ряду Q148K < Q148K/E138K < Q148K/G140S [7]. Интересно, что активность изученного нами ранее тройного мутанта E138K/G140S/Q148K интегразы FSU-A была несколько выше, чем у изученных здесь ферментов с двумя заменами: через 1500 мин от начала реакции эффективность 3'-процессинга для тройного мутанта достигала 30% от уровня ИН_А [22], в то время как у наиболее активного двойного мутанта ИН_А^{G140S/Q148K} она не превышала 20% (табл. 1). Таким образом, компенсаторный эффект от совокупности двух мутаций E138K и G140S оказался несколько большим, чем от отдельных вторичных замен G140S или E138K. Аналогичное наблюдение было сделано ранее для ВИЧ-1 субтипа В: добавление мутации

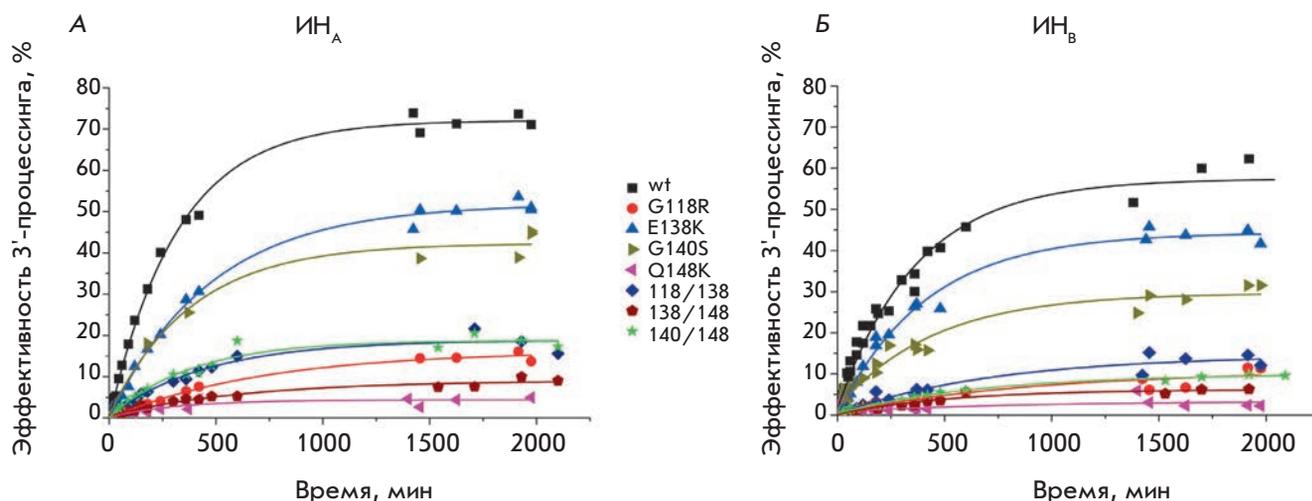


Рис. 1. Кинетические кривые накопления продукта 3'-концевого процессинга, катализируемого препаратами консенсусной интегразы субтипа А штамма FSU-A (А) и интегразы субтипа В штамма HXB-2 (Б) и их мутантными формами. Реакцию проводили при 37°C, концентрация фермента 100 нМ, концентрация U5-субстрата 3 нМ. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартная ошибка не превышала 12%

E138K к заменам Q148K/G140S повышало репликативную способность вируса, не влияя при этом на его чувствительность к ингибиторам переноса цепи [11].

Наконец, мы обнаружили, что замена G118R вызывает резкое снижение активности обеих интеграз – IN_A и IN_B (рис. 1, табл. 1). Этот результат несколько противоречит данным работы [17], в которой показано, что у рекомбинантной интегразы подтипа В с заменой G118R эффективность 3'-процессинга снижена незначительно, а двойные мутанты G118R/E138K и G118R/H51Y обладают даже несколько большей активностью в этой реакции, чем фермент дикого типа. В наших условиях внесение вторичной замены E138K также приводило к повышению активности как мутанта IN_A^{G118R} , так и мутанта IN_B^{G118R} , однако активность всех ферментов, несущих замену G118R, была существенно ниже, чем у исходных интеграз IN_A и IN_B (рис. 1, табл. 1). Указанное противоречие может объясняться разными условиями проведения 3'-процессинга, в частности, длиной ДНК-субстрата интегразы: мы работали со стандартным 21-звенным ДНК-дуплексом, а в работе [17] был использован 32-звенный субстрат.

Влияние мутаций на каталитическую активность интеграз IN_A и IN_B в реакции переноса цепи

Мы также изучили влияние выбранных мутаций на вторую реакцию, катализируемую интегразой – перенос цепи, в результате которой в условиях *in vitro* 3'-процессированный ДНК-субстрат встраивается либо в себя самого (гомологичный перенос цепи),

Таблица 1. Начальные скорости и эффективность 3'-процессинга, катализируемого интегразами IN_A и IN_B и их мутантными формами

Мутация	V_0 , пМ/мин*		Относительная эффективность реакции, %**	
	IN_A	IN_B	IN_A	IN_B
Дикий тип	10.1 ± 0.29	6.4 ± 0.19	100	100
G118R	0.98 ± 0.074	0.79 ± 0.15	21	20
E138K	4.8 ± 0.24	4.6 ± 0.9	69	76
G118R/E138K	2.6 ± 0.37	1.4 ± 0.18	24	24
G140S	4.3 ± 0.21	4.8 ± 0.75	58	51
Q148K	0.90 ± 0.16	0.65 ± 0.35	6	13
E138K/Q148K	1.2 ± 0.31	0.7 ± 0.61	13	11
G140S/Q148K	2.62 ± 0.11	1.3 ± 0.23	25	15

*Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений со стандартным отклонением.

**Приведена относительная эффективность реакции через 1500 мин, эффективность в случае исходной интегразы принята за 100%.

либо в любую другую случайную нуклеотидную последовательность или плазмиду (гетерологичный перенос цепи). В качестве ДНК-субстрата использовали дуплекс U5B-2/U5A. При гетерологичном переносе цепи в качестве мишени был использован синтетический 36-звенный олигонуклеотидный дуплекс. Положение места встраивания субстрата не зави-

сит от последовательности ДНК-мишени, поэтому при анализе продуктов реакции детектируются продукты разной длины.

Как уже было установлено нами ранее [22], в реакции переноса цепи активность $ИН_A$ несколько выше, чем $ИН_B$ (рис. 2). Также можно заметить разницу в профиле продуктов интеграции как при гомологичном (рис. 2А), так и при гетерологичном переносе цепи (рис. 2Б).

Наименее активными в реакции переноса цепи, как и в реакции 3'-процессинга, в обоих субтипах оказались мутанты, несущие замену Q148K. Эффективность гомологичного переноса цепи у них была снижена примерно до 5% от уровня фермента дикого типа. Неожиданно к значительному снижению эффективности реакции привела замена G140S (рис. 2А,В). Этот эффект мы наблюдали у ферментов обоих субтипов, $ИН_A^{G140}$ и $ИН_B^{G140}$, хотя данные о негативном эффекте замены G140S на активность рекомбинантной интегразы не опубликованы, а у вируса субтипа В, содержащего эту замену, выявлено лишь незначительное снижение интеграционной и репликативной способностей [7, 8]. Несмотря на негативное влияние замены G140S, ее комбинация с мутацией Q148K приводила к увеличению эффективности реакции, и белки $ИН_A^{G140S/Q148K}$ и $ИН_B^{G140S/Q148K}$ были активнее, чем $ИН_A^{Q148K}$ и $ИН_B^{Q148K}$ (рис. 2В). Некоторый компенсаторный эффект вызывала также и мутация E138K. Причем можно заметить, что у $ИН_A$ компенсаторный эффект был несколько сильнее при вторичной замене G140S, а у $ИН_B$ – E138K (рис. 2В). Интересно, что единичная замена E138K заметно повышала эффективность реакции для интеграз обоих субтипов (рис. 2В). В целом же, первичная мутация Q148K и ее компенсаторные замены G140S и E138K одинаково влияли на активность $ИН_A$ и $ИН_B$ как в 3'-процессинге, так и в переносе цепи. Таким образом, различия в первичной структуре интеграз не влияют на ферментативные свойства этой группы мутантов *in vitro*.

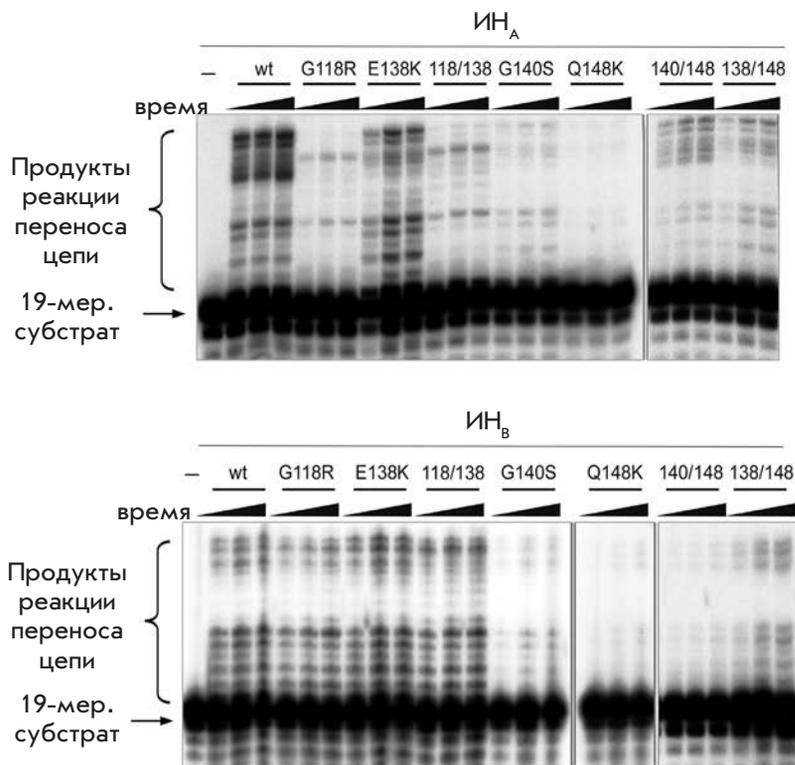
Интересно, что влияние другой группы мутаций – G118R и G118R/E138K – на активность интеграз разных субтипов в реакции переноса цепи различалось. Интегразы $ИН_A$ оказались более чувствительной к замене остатка G118, чем фермент субтипа В: у фермента $ИН_A^{G118R}$ эффективность гомологичного переноса цепи была резко снижена, а у $ИН_B^{G118R}$ существенно не изменилась (рис. 2А,В). Необходимо также отметить, что в случае $ИН_A$ мутация G118R приводила к смене точек интеграции, и вместо большого набора продуктов, наблюдаемого для исходной $ИН_A$, у мутанта $ИН_A^{G118R}$ четко выделялись только два доминирующих продукта (рис. 2А). Добавление компенсаторной мутации E138K практически не влияло

на активность мутанта $ИН_B^{G118R}$, в то время как двойной мутант $ИН_A^{G118R/E138K}$ был более активен, чем несущий одиночную замену $ИН_A^{G118R}$. Тем не менее эффективность реакции гомологичного переноса цепи, катализируемой $ИН_A^{G118R/E138K}$, достигала только 23% от уровня реакции, катализируемой исходной $ИН_A$ (рис. 2В).

Ранее было показано, что замена G118R в интегразе субтипа В приводит к существенному (более 90%) снижению ее активности в реакции гетерологичного переноса цепи [17]. Двойная мутация G118R/E138K приводила к частичному восстановлению активности, но она не достигала и 50% от уровня активности интегразы дикого типа [17]. Аналогичные эффекты наблюдались и для вируса субтипа В, содержащего указанные мутации: замена G118R вызывала значительное падение репликативной и интеграционной способностей вируса, а добавление мутации E138K приводило к их частичному восстановлению [18]. Проведенное нами изучение влияния замены G118R на способность $ИН_A$ и $ИН_B$ осуществлять гетерологичный перенос цепи показало, что как и при гомологичном переносе влияние этой замены на ферменты разных субтипов ВИЧ-1 различается (рис. 2Б). Введение мутации G118R снижало активность $ИН_B$ приблизительно на 50%, в то время как соответствующий мутант $ИН_A^{G118R}$ был практически неактивным. Вторичная замена E138K оказывала компенсаторный эффект только на интегразу субтипа В: активность двойного мутанта $ИН_B^{G118R/E138K}$ была несколько выше, чем фермента с одиночной заменой $ИН_B^{G118R}$ (рис. 2Б). Эти результаты согласуются с данными работы [17], поскольку разницу в активности мутантных форм интегразы $ИН_B$ можно объяснить различиями в условиях проведения реакции. Оба мутанта субтипа А, $ИН_A^{G118R}$ и $ИН_A^{G118R/E138K}$, имели одинаково низкую активность, хотя внесение единичной замены E138K приводило к повышению эффективности гетерологичного переноса интегразами обоих субтипов (рис. 2Б).

Уменьшение интегрирующей способности мутанта G118R в субтипе В ранее связали со снижением способности комплекса интегразы с ДНК-субстратом связывать ДНК-мишень [17]. В результате природного полиморфизма в положении 119 $ИН_B$ содержит Ser, а $ИН_A$ – Pro [21]. Отметим, что в ВИЧ-1 подтипа С, в лекарственно устойчивых штаммах которого чаще всего обнаруживается мутация G118R [16, 18], также присутствует Ser119. Остаток пролина увеличивает жесткость пространственной структуры интегразы в районе активного центра (Asp116 входит в каталитическую триаду). Очевидно, совокупность мутации G118R с Pro119 влияет на способность интегразы субтипа А взаимодействовать с ДНК-мишенью

А



Б



В

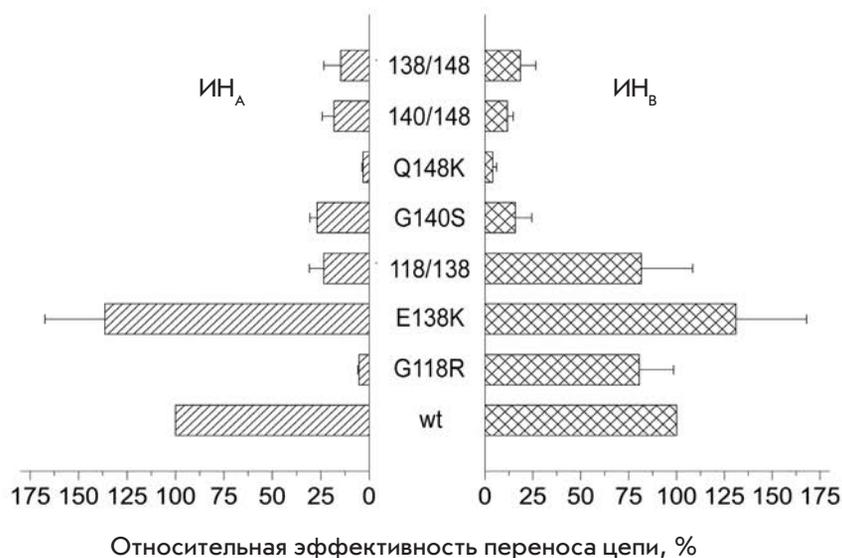


Рис. 2. Реакция переноса цепи, катализируемая мутантными формами интегразы ВИЧ-1 субтипов А и В. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. А – реакцию гомологичного переноса цепи проводили с использованием 100 нМ интегразы и 10 нМ субстрата U5B-2/U5A в течение 2, 4, 6 ч при 37°C. Б – реакцию гетерологичного переноса цепи проводили с использованием 100 нМ интегразы, 2 нМ субстрата U5B-2/U5A (преинкубация 30 мин при 25°C) и 8 нМ 36-звенной ДНК-мишени в течение 2 ч при 37°C. В – относительная эффективность гомологичного переноса цепи, катализируемого мутантными формами интеграз, эффективность реакции для IN_A и IN_B принята за 100%. Представлены средние значения со стандартным отклонением, полученные по крайней мере из трех независимых экспериментов

Таблица 2. Ингибирование реакции гомологичного переноса цепи, катализируемой интегразами ВИЧ-1 субтипов А и В и их мутантными формами, ралтегравиром (RAL), элвитегравиром (EVG) и XZ-259

Мутация	Ингибирующая активность, IC ₅₀ * (нМ), и изменение IC ₅₀ мутантов по сравнению с диким типом (FC)											
	ИН _А						ИН _В					
	RAL		EVG		XZ-259		RAL		EVG		XZ-259	
	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC
Дикий тип	5 ± 2	1	17 ± 5	1	40 ± 15	1	7 ± 3	1	25 ± 10	1	65 ± 10	1
G118R	12 ± 5	2.4	45 ± 10	2.6	40 ± 10	1	30 ± 10	4.3	90 ± 30	3.6	80 ± 20	1.2
E138K	7 ± 3	1.4	35 ± 5	2	50 ± 15	1.25	7 ± 5	1	20 ± 8	0.8	70 ± 10	1
G118R/E138K	7 ± 3	1.4	40 ± 10	2.4	30 ± 10	0.75	25 ± 8	3.6	50 ± 15	2	80 ± 15	1.2
G140S	15 ± 5	3	300 ± 50	18	150 ± 50	3.8	35 ± 15	5	200 ± 80	8	150 ± 50	2.3
Q148K	400 ± 100	80	700 ± 80	41	350 ± 100	8.8	1100 ± 250	157	1000 ± 200	40	600 ± 100	9.2
E138K/Q148K	350 ± 80	70	650 ± 100	38	200 ± 50	5	500 ± 150	71	600 ± 150	24	500 ± 200	7.7
G140S/Q148K	400 ± 150	80	450 ± 150	26	600 ± 150	15	1000 ± 200	200	850 ± 200	34	850 ± 100	13

*Результат не менее трех независимых экспериментов.

в значительно большей степени, чем сочетание G118R с Ser119. В результате ИН_А, содержащая замену G118R, существенно менее активна в реакциях переноса цепи, чем соответствующий мутант ИН_В.

Влияние мутаций на чувствительность интеграз ИН_А и ИН_В к ингибиторам переноса цепи

Нами изучено влияние выбранных мутаций лекарственной устойчивости на чувствительность интеграз к трем ингибиторам переноса цепи: RAL, EVG и новому ингибитору XZ-259, производному дигидро-1Н-изоиндола, с биохимической и антивирусной активностью, сравнимой с RAL [23]. Определена концентрация ингибитора, необходимая для снижения на 50% активности интегразы (IC₅₀) в реакции гомологичного переноса цепи (табл. 2; увеличение IC₅₀ отражает снижение чувствительности фермента к ингибитору).

Оказалось, что интегразы обоих субтипов имеют сравнимые значения IC₅₀ в отношении RAL и EVG, однако в среднем чувствительность ИН_А к обоим ингибиторам несколько выше, что коррелирует с данными, полученными нами ранее [22]. Чувствительность ИН_А к новому ингибитору – XZ-259, также была несколько выше, чем ИН_В; при этом значение IC₅₀ для ИН_В (65 нМ, табл. 2) хорошо согласуется с данными [23] (77 нМ).

При анализе влияния внесенных мутаций на чувствительность интегразы к ингибиторам удобно оперировать значениями FC, показывающими во сколько раз изменяется величина IC₅₀ у мутантов по сравнению с диким типом или, иными словами, насколько мутантные формы более устойчивы к ингибиторам, чем исходный фермент. Анализ FC семейства белков, содержащих первичную замену

Q148K (ИН^{Q148K}, ИН^{E138K/Q148K} и ИН^{G140S/Q148K}), показал, что устойчивость мутантных форм интеграз обоих подтипов к EVG возрастает сравнимым образом (табл. 2). Что касается RAL, то он в 2 раза лучше ингибировал интегразы субтипа А с заменами Q148K и G140S/Q148K, чем соответствующие варианты ИН_В. Компенсаторная мутация E138K практически в 2 раза снижала устойчивость ИН_В^{Q148K} к RAL и EVG, не оказывая при этом заметного влияния на устойчивость мутанта ИН_А^{Q148K}. Надо также отметить, что чувствительность к ингибитору XZ-259 обоих мутантов Q148K оказалась существенно выше, чем к EVG и особенно к RAL, что в случае интегразы субтипа В соответствует ранее полученным данным [23]. Интересно, что вторичная замена E138K несколько повышала чувствительность мутантов ИН_А^{Q148K} и ИН_В^{Q148K} к XZ-259, в то время как дополнительная замена G140S снижала ее (табл. 2).

Анализ FC семейства белков с заменами G118R и G118R/E138K выявил незначительное снижение чувствительности интеграз обоих субтипов к RAL и EVG (табл. 2). При этом единичная мутация G118R несколько сильнее снижала чувствительность фермента субтипа В, чем субтипа А (табл. 2). Интересно, что компенсаторная замена E138K уменьшала возникающую резистентность (табл. 2). Важно также отметить, что к ингибитору XZ-259 устойчивости вообще не возникало. В целом наши результаты хорошо коррелируют с опубликованными данными. Так, изолят ВИЧ-1 субтипа CRF02_A/G, содержащий замену G118R в гене интегразы, оказался резистентным (FC > 100) ко всем разрешенным к терапевтическому применению ингибиторам интегразы: RAL, EVG и DTG [15]. В то же время у ВИЧ-1 субтипа В (клон pNL4-3), в геном которого была введена эта мута-

ция, устойчивость к этим ингибиторам была крайне незначительной (FC = 3.1 для EVG, 8.2 для RAL и 10 для DTG) [15]. Таким образом, наша работа подтверждает неоднородность эффекта первичной мутации G118R на лекарственную устойчивость ВИЧ-1 разных субтипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено первое систематическое исследование ферментативных свойств вариантов консенсусной интегразы ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU-A, доминирующего на территории бывшего Советского Союза, с мутациями G118R и Q148K, вызывающими устойчивость вируса к ингибиторам переноса цепи. Мы показали, что чувствительность интеграз субтипа А штамма FSU-A к разрешенным к терапевтическому применению ингибиторам RAL и EVG, а также к новому ингибитору XZ-259 несколько выше, чем у фермента субтипа В. Обнаружено, что ассоциированная с устойчивостью к RAL и EVG первичная мутация Q148K вызывает резкое снижение активности интегразы субтипа А, которое частично компенсируется за счет вторичных мутаций E138K и G140S. Аналогичная зависимость наблюдалась и для интегразы субтипа В. В то же время первичная мутация G118R снижала интеграционную активность фермента субтипа А значительно сильнее, чем интегразы субтипа В штамма НХВ-2. Это может быть связано

с природным полиморфизмом интегразы, в частности с присутствием Pro119 в ИН_А вместо Ser119 в ИН_В. Можно предположить, что замена Ser119Pro, приводящая к более жесткой конформации активного центра интегразы субтипа А, обеспечивает более высокую активность этого фермента, но при этом снижает его способность адаптировать активный центр к мутации G118R. Сниженная мутациями лекарственной устойчивости активность рекомбинантной интегразы обычно соответствует пониженной репликативной способности мутантного вируса, в силу этого можно ожидать появления и закрепления лекарственно устойчивых вариантов FSU-A, несущих первичную мутацию Q148K и компенсаторные мутации E138K и/или G140S, в то время как появление и закрепление лекарственно устойчивых вариантов FSU-A с заменой G118R представляется маловероятным. ●

Мы благодарим д-ра Xue Zhi Zhao (Chemical Biology Laboratory, Center for Cancer Research, Frederick National Laboratory, NIH, USA) за любезно предоставленный ингибитор XZ-259.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-04-91440-НИЗ_а, 13-04-01523а, 14-04-00833_а, 14-04-32086_мол-а) и программой развития Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ПНР 5.13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Quashie P.K., Mesplède T., Wainberg M.A. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013. V. 26. № 1. P. 43–49.
- Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wiriden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
- Charpentier C., Karmochkine M., Laureillard D., Tisserand P., Bélec L., Weiss L., Si-Mohamed A., Piketty C. // *HIV Med.* 2008. V. 9. № 9. P. 765–770.
- Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., BENCHMRK Study Teams, et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
- Goethals O., Clayton R., van Ginderen M., Vereycken I., Wagemans E., Geluykens P., Dockx K., Strijbos R., Smits V., Vos A., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10366–10374.
- Stanford HIV Drug Resistance Database // <http://hivdb.stanford.edu/DR/INIResiNote.html>
- Nakahara K., Wakasa-Morimoto C., Kobayashi M., Miki S., Noshi T., Seki T., Kanamori-Koyama M., Kawauchi S., Suyama A., Fujishita T., et al. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 141–146.
- Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1193–1201.
- Abram M.E., Hluchanich R.M., Goodman D.D., Andreatta K.N., Margot N.A., Ye L., Niedziela-Majka A., Barnes T.L., Novikov N., Chen X., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2013. V. 57. № 6. P. 2654–2663.
- Fransen S., Gupta S., Danovich R., Hazuda D., Miller M., Witmer M., Petropoulos C.J., Huang W. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 22. P. 11440–11446.
- Goethals O., Vos A., van Ginderen M., Geluykens P., Smits V., Schols D., Hertogs K., Clayton R. // *Virology.* 2010. V. 402. № 2. P. 338–346.
- Canducci F., Ceresola E.R., Boeri E., Spagnuolo V., Cossarini F., Castagna A., Lazzarin A., Clementi M. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 204. № 11. P. 1811–1815.
- Underwood M.R., Johns B.A., Sato A., Martin J.N., Deeks S.G., Fujiwara T. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2012. V. 61. № 3. P. 297–301.
- Kobayashi M., Yoshinaga T., Seki T., Wakasa-Morimoto C., Brown K.W., Ferris R., Foster S.A., Hazen R.J., Miki S., Suyama-Kagitani A., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2011. V. 55. № 2. P. 813–821.
- Malet I., Gimferrer Arriaga L., Artese A., Costa G., Parrotta L., Alcaro S., Delelis O., Tmeizeh A., Katlama C., Valantin M.A. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 8. P. 2118–2122.
- Quashie P.K., Mesplède T., Han Y.S., Oliveira M., Singhroy D.N., Fujiwara T., Underwood M.R., Wainberg M.A. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 5. P. 2696–2705.
- Quashie P.K., Mesplède T., Han Y.S., Veres T., Osman N., Hassounah S., Sloan R.D., Xu H.T., Wainberg M.A. //

- Antimicrob. Agents. Chemother. 2013. V. 57. № 12. P. 6223–6235.
18. Bar-Magen T., Sloan R.D., Donahue D.A., Kuhl B.D., Zabeida A., Xu H., Oliveira M., Hazuda D.J., Wainberg M.A. // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 18. P. 9210–9216.
19. Malet I., Fourati S., Charpentier C., Morand-Joubert L., Armenia D., Wirten M., Sayon S., Van Houtte M., Ceccherini-Silberstein F., Brun-Vézinet F., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2011. V. 66. № 12. P. 2827–2830.
20. Лаповок И.А., Лара В.Ю., Васильев А.В., Саламов Г.Г., Казеннова Е.В., Матковский И.А., Мохний Г.А., Мельник Т.А., Бобкова М.Р. // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия.* 2012. Т. 4. № 2. С. 73–81.
21. Krotova O., Starodubova E., Petkov S., Kostic L., Agapkina J., Hallengård D., Viklund A., Latyshev O., Gelius E., Dillenbeck T., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. e62720.
22. Shadrina O., Krotova O., Agapkina J., Knyazhanskaya E., Korolev S., Starodubova E., Viklund A., Lukashov V., Magnani M., Medstrand P., et al. // *Biochimie.* 2014. V. 102. P. 92–101.
23. Métifiot M., Maddali K., Johnson B.C., Hare S., Smith S.J., Zhao X.Z., Marchand C., Burke T.R. Jr., Hughes S.H., Cherepanov P., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 1. P. 209–217.
24. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 9285–9294.
25. Marinello J., Marchand C., Mott B.T., Bain A., Thomas C.J., Pommier Y. // *Biochemistry.* 2009. V. 47. № 36. P. 9345–9354.

УДК 577.21; 578.821

Роль гликозилирования белка E2 вируса гепатита С в функционировании белков оболочки вируса в клетках насекомых и млекопитающих

О. В. Орлова¹, В. Л. Друца², П. В. Спири¹, А. В. Иванов¹, В. С. Прасолов¹, П. М. Рубцов¹, С. Н. Кочетков¹, С. Н. Белжеларская^{1*}

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

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

*E-mail: belj@eimb.ru

Поступила в редакцию 15.09.2014

РЕФЕРАТ Белки оболочки вируса гепатита С (ВГС) E1 и E2, являясь компонентами вириона, участвуют в формировании инфекционных частиц вируса в зараженной клетке. Детальное строение частицы ВГС остается малоизученным, причем наименее изучен процесс сборки вирионов и их выход из клетки. Предполагается, что свойства вириона зависят от гликозилирования белковой оболочки вируса в клетке, а гликаны в некоторых сайтах гликозилирования этих белков важны для их функционирования и прохождения жизненного цикла ВГС. N-гликаны гликопротеинов могут влиять на формирование вирусных частиц, связывание вируса с клеткой и патогенез гепатита С. Мы изучили влияние гликанов на сворачивание гликопротеина E2, образование функциональных гликопротеиновых комплексов и формирование вирусных частиц в клетках насекомых и млекопитающих. С этой целью в сайты N-гликозилирования E2 вируса гепатита С (генотип 1b штамм 274933RU) вводили точечные мутации и анализировали мутантные белки в бакуловиральной системе экспрессии. Удаление единичных сайтов гликозилирования гликопротеина E2, за исключением сайта N6, не сказывалось на эффективности его синтеза в клетках насекомых Sf9, а электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастала пропорционально снижению числа сайтов гликозилирования. В отличие от клеток Sf9, уровень синтеза гликопротеина E2 ВГС в клетках Hek293T человека зависел от присутствия гликанов в сайтах гликозилирования N1 и N8. В то же время удаление гликанов в сайтах N1, N2 и N10 приводило к накоплению непродуктивных димеров E1E2 в виде агрегатов и подавлению продуктивной сборки вирусоподобных частиц как в клетках насекомых, так и в клетках млекопитающих. Удаление единичных сайтов гликозилирования E2 ВГС не влияло на синтез РНК структурных белков и образование вирусоподобных частиц в клетках насекомых и млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бакуловиральная система экспрессии, белки оболочки E1 и E2, вирус гепатита С, вирусоподобные частицы, N-гликозилирование белков, клетки насекомых Sf9, клетки млекопитающих Hek293T и Huh7.0, олигонуклеотид-направленный мутагенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующие единицы; ВГС – вирус гепатита С; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С – один из существенных патогенов человека, который вызывает тяжелые заболевания печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Выбор средств, применяемых при инфекции ВГС, очень ограничен, а профилактической вакцины не существует. Высокая репликативная активность вируса вместе с отсутствием у вирусной РНК-полимеразы корректорской функции создают

условия для большой генетической изменчивости вируса.

Все это приводит к тому, что в сыворотке инфицированного человека ВГС циркулирует не как один вид, а как совокупность квазивидов, геномы которых различаются на 1–5%. Разные штаммы вируса гепатита С одного подтипа могут отличаться по нуклеотидной последовательности на 5–15%, подтипы на 10–30%, а отдельные генотипы на 30–50% [1].

Некоторые штаммы обладают повышенной вирулентностью, но конкретные молекулярные детерминанты, определяющие такой фенотип, еще не определены. Основной клеточной мишенью ВГС являются гепатоциты. Связывание вирусной частицы с клеткой все еще недостаточно изучено, известны не все рецепторы, в том числе специфичные для ВГС.

Связывание вирусной частицы с поверхностными рецепторами гепатоцитов и ее поглощение клетками определяются гликопротеинами оболочки вируса. Механизм сборки вирусных структурных белков и РНК в новые вирусные частицы, а также пути проникновения вируса в клетку по-прежнему недостаточно изучены [2]. ВГС – единственный представитель рода *Hepacivirus* – относится к семейству *Flaviviridae*. Его геном кодирует один полипротеин-предшественник. Под воздействием клеточных и вирусных протеаз образуются структурные и неструктурные белки вируса [3–5]. Капсидный белок С и белки оболочки Е1 и Е2 относятся к структурным белкам. Белки оболочки подвергаются посттрансляционной модификации – N-гликозилированию, при которой малоразветвленная олигосахаридная цепочка, состоящая из девяти остатков маннозы (Man) и трех остатков глюкозы (Glc), присоединяется к специфическим остаткам аспарагина в последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X – любая аминокислота, кроме пролина) [6, 7]. Гликопротеины вирусной оболочки высоко гликозилированы. Степень консервативности сайтов гликозилирования 9–11 в Е2 и 4–5 в Е1 очень высока, что указывает на их важную роль в функционировании этих белков в жизненном цикле ВГС [8]. Следует отметить, что до сих пор не известно истинное число сайтов гликозилирования белков, какие именно сайты участвуют в модификации белка и все ли потенциальные сайты подвергаются гликозилированию *in vivo*.

Характер гликозилирования гликопротеина играет важную роль в его функции. Так, гликопротеин Е2 может быть рецепторсвязывающей субъединицей оболочки ВГС. Показано, что ряд гликанов Е2, в зависимости от штамма, может определять возможность проникновения вируса в клетку, создавая условия для взаимодействия гликопротеина Е2 с клеточными рецепторами. Определенные гликаны Е2 вовлечены в модуляцию иммунного ответа. Предполагается, что гликаны, связанные с вирусной оболочкой, влияют на укладку белков с участием шаперонов эндоплазматического ретикулума (ЭР) и продуктивную сборку вирусных частиц, способных проникать и инфицировать новую клетку. Присоединение олигосахарида к белку сопряжено с его фолдингом, при этом гликопротеин входит в кальнексин-кальретинуловый цикл, специфически взаимодействуя с шаперо-

нами ЭР, которые обеспечивают его частичное сворачивание. Связывание гликопротеинов с шаперонами и освобождение от них сопровождаются отщеплением («подстриганием») избыточных остатков глюкозы и маннозы и регликозилированием N-связанных гликанов.

Белок оболочки Е2 накапливается в люмене ЭР как в виде правильно свернутого гликопротеина, так и в виде агрегатов неправильно свернутых белков. Некоторое количество Е2 остается негликозилированным в цитозоле и после убиквитинирования удаляется через протеасомный путь. Известно, что белок кальнексин взаимодействует с нековалентно связанными комплексами Е1Е2, а кальретинулин – с агрегатами неправильно свернутых димеров Е1Е2 [9]. Комплексы первого типа обеспечивают связывание вируса с рецепторами клетки и проникновение вирусной частицы в клетку, влияют на формирование его антигенного состава и, возможно, играют определяющую роль в вирусном патогенезе [10]. Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов может приводить к появлению дефектных вирусных частиц, не способных, вероятно, к связыванию с новыми клетками [11–13]. Белки оболочки ВГС также могут влиять на сворачивание друг друга. Так, Е2 действует как шаперон при фолдинге Е1 и формировании функциональных гетеродимеров, но и белок Е1 также помогает продуктивной укладке Е2 [14, 15]. Процесс сборки вирионов ВГС недостаточно изучен из-за отсутствия приемлемых клеточных моделей, позволяющих получать инфекционные вирусные частицы. Роль гликанов в функционировании белков оболочки вируса различных генотипов в зараженной клетке также остается малоизученной.

В настоящей работе мы изучали влияние N-гликанов гликопротеина Е2 вируса гепатита С генотипа 1b (штамм 274933RU [16]) на синтез структурных белков, формирование вирусных частиц в клетках насекомых Sf9 и почки человека Нек293Т, трансфицированных бакуловирусными векторами, направляющими экспрессию генов структурных белков ВГС [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные клетки, клеточные культуры и плазмиды. Использовали клетки *Escherichia coli*, клетки *Spodoptera frugiperda* Sf9 и клетки млекопитающих Нек293Т и Нuh7.0. Клетки штаммов DH5a и DH10Bac *E. coli* (Gibco-BRL, США) трансформировали плазмидными ДНК согласно рекомендациям фирмы (Amersham, США). Выделение и очистку плазмид, расщепление рестриктазами, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [18].

Клетки насекомых Sf9 культивировали в среде Sf-900 II, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, при 27°C, используя основные технические приемы, разработанные ранее и описанные в инструкции [19]. Для определения титра вируса, амплификации рекомбинантного вируса, заражения клеток Sf9 рекомбинантным бакуловирусом и анализа экспрессии вирусных генов использовали ту же инструкцию.

Клетки эмбриональной почки человека (линия Нек293Т) культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно, при температуре 37°C и атмосфере 5% CO₂.

Рекомбинантные конструкции, несущие кДНК, соответствующие генам структурных белков ВГС, **рекомбинантные бакмиды**, а также **рекомбинантный бакуловирус** bv-CE1E2 получали и анализировали по ранее отработанным методикам [20].

Сайт-направленный мутагенез. Фрагмент ДНК, соответствующий последовательности кДНК гена, кодирующего гликопротеин E2 ВГС, клонировали в плазмиде рFastBacHTb по сайтам NcoI-EcoRI с использованием стандартного протокола [20]. Для получения серии рекомбинантных плазмид, несущих кДНК белка E2 с точечными заменами в сайтах гликозилирования, сконструировали олигонуклеотидные праймеры (таблица). Каждый праймер состоял из 25–30 нуклеотидов и содержал последовательность, кодирующую сайт N-гликозилирования: Asn-X-Thr/Ser (X≠Pro), в котором триплет, кодирующий Asn, замещен триплетом, кодирующим Gln.

Для мутагенеза использовали метод, описанный Друцей и соавт. [21]. ПЦР проводили в программ-

руемом термостате ЦиклоТемп 107 (ЗАО «Ресурс Прибор», Россия). Наличие всех заданных замен нуклеотидов подтверждали секвенированием.

Анализ суммарной клеточной ДНК. Суммарную клеточную ДНК выделяли из клеток насекомых через 72 ч после заражения рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2, bv-E2mut, bv-E1E2mut, bv-CE1E2mut (с множественностью заражения 5 БОЕ/кл) [20]. Наличие кДНК генов структурных белков ВГС в суммарной клеточной ДНК оценивали с помощью ПЦР, используя праймеры к бакуловирусному вектору рFastBacHT (прямой 5'-GTGGTTGGCTACGTATACTCC-3', обратный 5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGC-3').

Анализ РНК ВГС с помощью ОТ-ПЦР. Клетки Sf9 заражали рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2mut (5 БОЕ/кл), инкубировали в течение 72 ч при 27°C. Через 72 ч отбирали среду и удаляли клеточный дебрис низкоскоростным центрифугированием, а супернатант центрифугировали через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g в течение 16 ч при 4°C (центрифуга Beckman Coulter Optima L-100XP, ротор 80Ti). РНК экстрагировали из осадка с помощью реагента TRIzol (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя и обрабатывали ДНКазой I (Promega). Обратную транскрипцию проводили с использованием Phusion RT-PCR Kit (Thermo Scientific). Полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры к генам структурных и неструктурных белков ВГС. Суммарную клеточную РНК получали из зараженных рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2mut (5 БОЕ/кл) клеток Sf9, инкубированных при 27°C в течение 72 ч и трижды промытых фосфатно-солевым буфером PBS. Выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию проводили по протоколам, указанным выше.

Использованные праймеры

Праймер	Ориентация	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
28-E2N1m	–	TG AAT ACC CAA GGC AGC TGG CAC AT
30-E2N2m	–	TGG CAC ATC CAA AGT ACT GCC CTA AAT TGC
30-E2N3m	–	GCC CTA AAT TGC CAA GAC TCC CTC CAA ACT
30-E2N4m	–	GCA CAC AAG TTC CAA TCG TCC GGG TGC CCG
25-E2N6m	–	TGG GGG GAG CAA GAG ACA GAC GTG A
30-E2N7m	–	GTG ATG CTC CTC CAA AAC ACG CGT CCG CCA
30-E2N8m	–	TGT ACA TGG ATG CAA AGT ACT GGG TTC ACT
27-E2N9m	–	GGG GTC GGT CAA CGC ACC TTG ATT TGC
30-E2N10m	–	TAC CCC TGC ACT CTC CAA TTT TTC CAT CAT
27-E2N11m	–	GCC GCA TGC CAA TGG ACT CGA GGA GAG CGC
E2 for	+	AGG TCT AGA ATG TTA TGA TTG TTT TGC TAC
E2 Back	+	CT ATA GTG TCA CCT AAA TCC GAA AGC TTC GGC CTC AGC TTG AG

Клетки Нек293Т трансфицировали рекомбинантными плазмидами VacMamCE1E2mut-GFP (5 БОЕ/кл) и инкубировали при 37°C в течение 48 ч, затем отбирали среду, выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию и амплификацию по протоколам, указанным выше.

Антитела к ВГС. Использовали моноклональные антитела мыши к белкам E1 ВГС (Her C E1 1879: sc-65459) и E2 ВГС (Her C E2 BDI167: sc-57769) (SantaCruz Biotechnology, США), а также моноклональные антитела к кальнексину (AF18) и кальретикулину (FMC75) (Abcam, Великобритания). Поликлональные антитела кролика к структурному белку С любезно предоставлены М.Г. Исагулянц (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва). В качестве вторичных антител использовали конъюгаты пероксидазы хрена с антителами против IgG мыши (AB6706-1EA) (Sigma, США).

Вестерн-блот и иммуноосаждение. Через 72 ч после заражения рекомбинантными бакуловирусами bv-E2mut, bv-E1E2mut, bv-CE1E2mut (множественность заражения 5 БОЕ/кл) клетки Sf9 собирали, трижды отмывали в PBS (1.47 mM KH_2PO_4 , 4.29 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl), ресуспендировали в лизирующем буфере TNC, содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C). Клеточный лизат наносили на 12% ПААГ, каждый образец содержал 10 мкг белка. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (Amersham Biosciences, США) методом полусухого электропереноса. Мембраны промывали в буфере PBS, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, инкубировали с первичными антителами к структурным белкам E1 или E2 ВГС (в разведении 1 : 1500 для E1 и 1 : 2000 для E2), к кальнексину или к кальретикулину (в разведении 1 : 1000 и 1 : 2000 соответственно), а затем с вторичными антителами (в разведении 1 : 20000). Иммуные комплексы проявляли, используя хемилюминесцентные реагенты ECL и ECL Plus (Western blotting detection reagents and analysis systems, Amersham Biosciences), согласно рекомендациям производителя.

Для иммуноосаждения клетки, инфицированные рекомбинантными бакуловирусами bv-E2mut, bv-E1E2mut и bv-CE1E2mut собирали через 72 ч после заражения, лизировали, удаляли клеточные обломки и ядра. Структурные белки и образуемые ими комплексы осаждали моноклональными антителами к E1 ВГС и E2 ВГС, кальнексину и кальретикулину в разведении 1 : 100 (согласно рекомендациям производителя). Осажденные белки разделяли при помощи электрофореза в 12% ПААГ, переносили на нитро-

целлюлозную мембрану и инкубировали с первичными антителами в разведениях, указанных выше, а затем обрабатывали вторичными антителами.

Анализ гликозилирования – обработка эндогликозидазой Н (Endo Н). Белки клеточного лизата инкубировали с соответствующими моноклональными антителами при 4°C. Полученный комплекс осаждали с помощью белок-G-сефарозы (BioVision, США). К осажденному белку (20 мкг) добавляли 1 мкл десятикратного денатурирующего буфера (5% SDS, 0.4 M DTT), объем смеси доводили водой до 10 мкл и кипятили в течение 10 мин. Затем объем доводили до 20 мкл, добавляя 2 мкл десятикратного реакционного буфера G5 (50 mM цитрат Na), 3 мкл воды и 5 мкл раствора Endo Н (5 ед. акт.) (P0702S BioLabs Inc., Великобритания). Инкубировали в течение 15 ч при 37°C и анализировали при помощи электрофореза в 12% ПААГ.

Получение и очистка вирусоподобных частиц (ВПЧ). Клетки, растущие в монослое при 27°C, заражали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (10 БОЕ/кл). Через 72 ч клетки (2×10^8) собирали, отмывали 3 раза PBS, ресуспендировали в лизирующем буфере TNC: 10 mM Трис-НСl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF, коктейль ингибиторов протеаз II (Protease Inhibitor Cocktail II, Calbiochem, США) (1 : 200), содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. ВПЧ из гомогенизированных лизатов очищали от клеточных остатков низкоскоростным центрифугированием (1200 g, 15 мин, 4°C). Затем ВПЧ концентрировали центрифугированием через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g в течение 16 ч при 4°C. Осадок ВПЧ ресуспендировали в буфере TNC, содержащем 1 mM PMSF, ингибиторы протеаз (1 : 200), и анализировали с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы.

Центрифугирование в сахарозном градиенте. Осадок ВПЧ, ресуспендированный в 100 мкл буфера TNC, содержащего 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200), наслаивали на градиент концентраций сахарозы (от 10 до 60% в 50 mM Трис-НСl, 100 mM NaCl, pH 7.4) и центрифугировали при 200000 g в течение 2.5 ч при 4°C (центрифуга Beckman Coulter Optima L-100XP, ротор 80Ti). Собирали 10 фракций по 1 мл, затем каждую фракцию концентрировали высокоскоростным ультрацентрифугированием при 230000 g в течение 16 ч при 4°C, осадок растворяли в 100 мкл буфера TNC, содержащего 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200), и анализировали с помощью вестерн-блотинга [18, 22].

Анализ связывания ВПЧ с рецептором CD81. Клетки Huh7.0 инкубировали в присутствии ВПЧ, полученных в клетках Sf9, в течение 1 ч при 4°C. В качестве контроля использовали клетки Huh7.0,

предварительно инкубированные с антителами к CD81 (20 мкг/мл, 1 ч при 4°C) для блокировки рецептора CD81. Клетки собирали, дважды промывали PBS для удаления не связавшихся ВПЧ и анализировали с помощью вестерн-блотинга с антителами к E2.

Флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия. Через 48 ч после трансфекции рекомбинантными плазмидами VacMamCE1E2mutGFP клетки Нек293Т снимали с подложки раствором трипсина, собирали центрифугированием, дважды промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали в проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter EPICS, США) и с помощью вестерн-блотинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание генно-инженерных конструкций и сайт-направленный мутагенез

Ранее мы изучили влияние N-гликанов белка E1 ВГС на его фолдинг и сборку продуктивных гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых и млекопитающих. Мы показали, что гликаны, связанные с сайтами N1 и N5 белка E1, играют наиболее существенную роль в образовании правильной конформации этих белков [23]. В настоящей работе мы исследовали участие гликанов гликопротеина E2 ВГС

(генотип 16 штамм 274933RU [16]) в сворачивании гликопротеинов, образовании функциональных гликопротеиновых комплексов и формировании вирусных частиц в клетках насекомых и млекопитающих. Для этого ввели точечные мутации в сайты N-гликозилирования E2 и экспрессировали гены мутантных белков в клетках насекомых и млекопитающих с использованием бакуловирусной системы экспрессии [17, 20].

Фрагмент ДНК, соответствующий последовательности кДНК гена, кодирующего гликопротеин E2 ВГС, клонировали в плазмиде pFastVacHTb по сайтам NcoI–EcoRI с использованием стандартного протокола [20]. Для получения серии рекомбинантных плазмид, несущих кДНК белка E2 с точечными заменами в сайтах гликозилирования, сконструировали олигонуклеотидные праймеры согласно Друца и соавт. [20, 21] (см. «Экспериментальную часть»). Присутствие всех заданных замен нуклеотидов подтверждали секвенированием. В результате получили векторные ДНК pFastVacHTbE2mut, содержащие гены E2 с введенными мутациями, которые использовали затем при конструировании векторов pFastVacHTbE1E2mut, pFastVacHTbCE1E2mut и VacMamCE1E2mutGFP. На рис. 1 показана схема расположения потенциальных сайтов N-гликозилирования в белке E2 ВГС и в сконструированных мутантных вариантах E2.

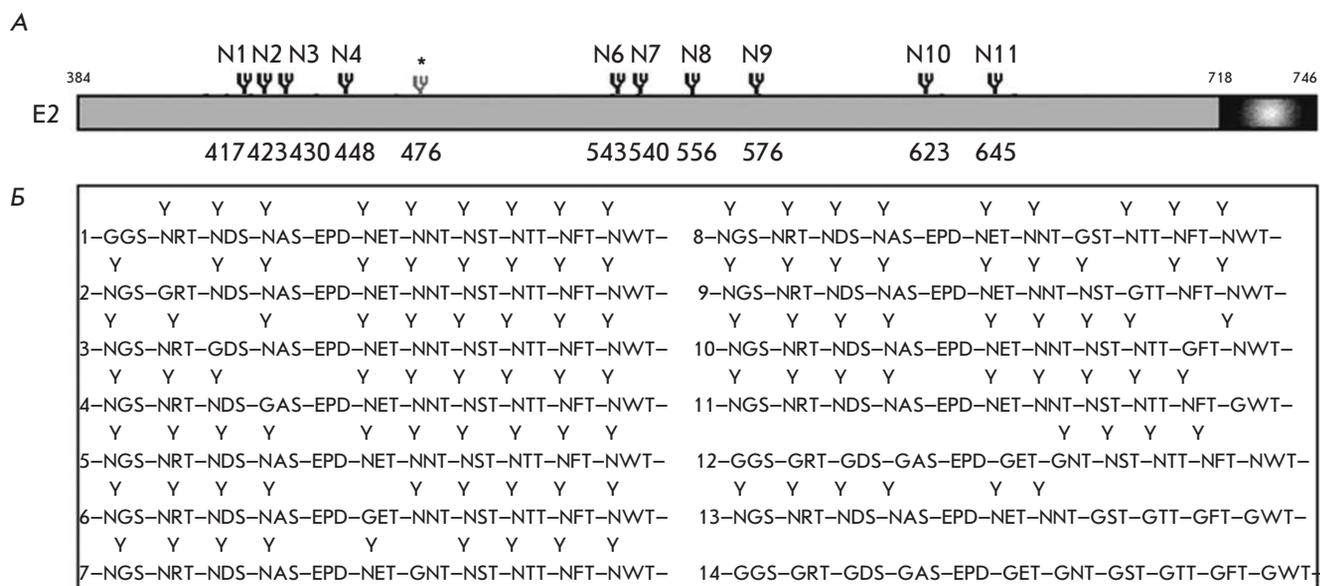


Рис. 1. Сайты N-гликозилирования в структурном белке E2 ВГС и в его мутантных вариантах. А – схема расположения сайтов гликозилирования N1–N11 в полипептидной цепи E2 ВГС. Б – схематическое изображение мутантных вариантов гликопротеина E2 с модифицированными (нарушенными) сайтами гликозилирования: 1 – N1; 2 – N2; 3 – N3; 4 – N4; 5 – исходный вариант E2 дикого типа; 6 – N6; 7 – N7; 8 – N8; 9 – N9; 10 – N10; 11 – N11; 12 – N1–N7(mL); 13 – N8–N11(mR); 14 – N1–N11(ΣN). Сайты гликозилирования отмечены знаком «Y»

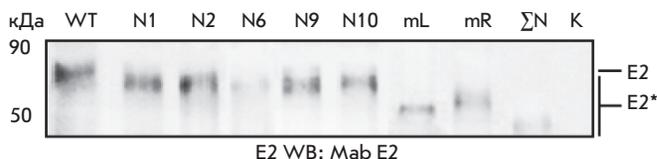


Рис. 2. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг (WB) в денатурирующем 12% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами: WT – E2 дикого типа; N1, N2, N6, N9, N10, N1–N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в соответствующих сайтах гликозилирования; N1–N11(ΣN) – во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Здесь и на рис. 3–9 цифры слева – маркеры молекулярной массы белков, кДа. * – мутантные белки обозначены E2*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКА E2 ВГС В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на экспрессию генов мутантных белков E2 в клетках насекомых и млекопитающих

Ранее мы показали, что в клетках насекомых происходит эффективное посттрансляционное гликозилирование белков оболочки ВГС [22]. Мы показали также, что нарушение сайтов гликозилирования гликопротеина E1 ВГС в различных комбинациях не влияет на его синтез в клетках Sf9, но отсутствие углеводных цепей в сайтах N1 и N5 E1 существенно уменьшает уровень его экспрессии в клетках млекопитающих HeK293T [23]. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в клетках насекомых Sf9, проведенный нами, показал, что нарушение сайтов гликозилирования в разных комбинациях (за исключением сайта N6), не влияет на синтез E2, при этом электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования (рис. 2).

Оказалось, что интенсивность синтеза E2 ВГС в клетках млекопитающих зависит от присутствия гликанов в определенных сайтах гликозилирования. Для анализа влияния N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на эффективность экспрессии белков оболочки вируса в клетках млекопитающих были сконструированы плазмиды pFastBacMam1GFP на основе бакуловирусного вектора с кассетами экспрессии под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV), несущие кДНК мутантных E2. Полученными векторными ДНК pFastBacMamCE1E2mutGFP, кодирующими E2 с точечными заменами в сайтах гли-

козилирования N1, N2, N4, N8, N10, mL(N1–N7), mR(N8–N11) и ΣN(N1–N11), трансфицировали клетки HEK293T человека. Экспрессию генов мутантных белков E2 ВГС и эффективность их гликозилирования в клетках оценивали по уровню синтеза полипептидов CE1E2mutGFP, используя методы проточной цитофлуориметрии и электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблоттингом (рис. 3А,Б).

Согласно результатам проточной цитофлуориметрии, отсутствие сайтов гликозилирования N1 и N8 E2 ВГС приводит к значительному снижению флуоресценции GFP, что свидетельствует о снижении синтеза E2 в составе полипептидов CE1E2mutGFP

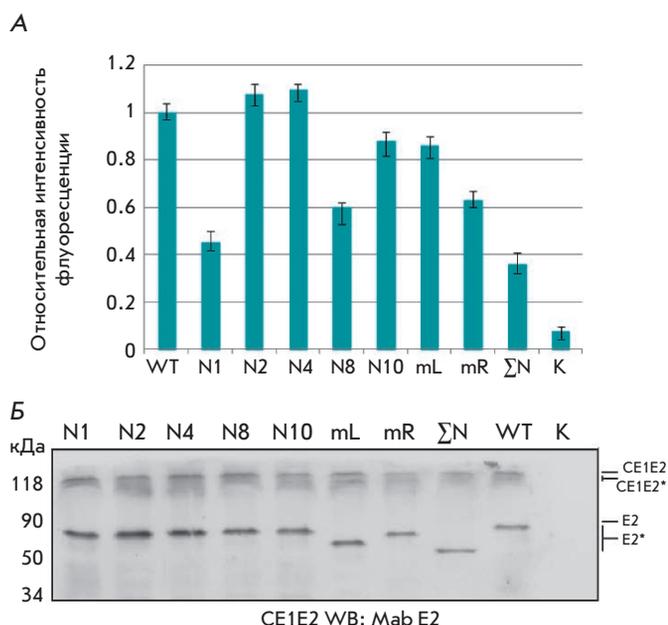


Рис. 3. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе полипептида CE1E2 ВГС в клетках млекопитающих. А – анализ флуоресценции зеленого белка GFP в клетках HEK293T, трансфицированных рекомбинантными плазмидами pFastBacMamCE1E2mutGFP, методом проточной цитофлуориметрии. По оси ординат отложены относительные значения интенсивности флуоресценции, по оси абсцисс указаны варианты E2 с мутациями в сайтах гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, mL(N1–N7), mR(N8–N11) и ΣN(N1–N11); Б – вестерн-блоттинг в денатурирующем 8% ПААГ с антителами к E2 ВГС лизатов клеток HeK293T, трансфицированных pFastBacMamCE1E2GFP, синтезирующих различные варианты E2: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайтах гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, N1–N7(mL); N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

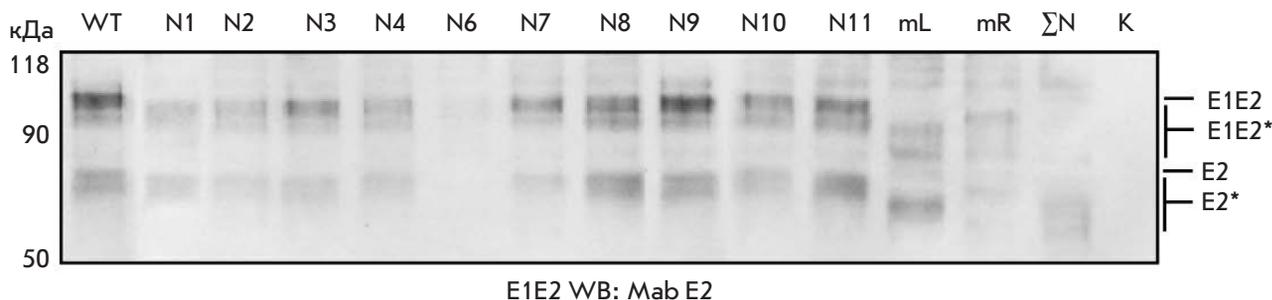


Рис. 4. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе E1E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующих E2 в составе E1E2: WT – E2 дикого типа; N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1-N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в сайте гликозилирования; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

в клетках Hek293T по сравнению с исходным. К незначительному снижению синтеза гликопротеина E2 ведет мутация в сайте N10. Электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблоттингом показал, что мутантные варианты E2 синтезируются в клетках млекопитающих, и интенсивность их синтеза зависит от присутствия гликанов в определенных сайтах гликозилирования белка. При этом электрофоретическая подвижность белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования.

Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе E1E2 показал, что отсутствие гликанов в любом сайте, кроме N6, не влияет на синтез в клетках Sf9 (рис. 4).

Обработка мутантных гликопротеинов E2 ВГС эндогликозидазой Endo H с последующим вестерн-блоттингом показала, что мутантные варианты гликопротеина чувствительны к действию эндогликозидазы (не представлено), что в клетках насекомых происходит гликозилирование синтезированных мутантных гликопротеинов.

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на образование продуктивного комплекса E1E2 в клетках насекомых

Мы показали ранее, что сборка гликопротеиновых комплексов E1E2 ВГС в клетках насекомых зависит от нарушения сайтов гликозилирования N1 и N5 гликопротеина E1, в то время как мутации остальных сайтов на сборку не влияют [23]. В настоящей работе о влиянии нарушения сайтов гликозилирования E2 на его свертывание и образование гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых, как и в случае с мутантным гликопротеином E1, судили по взаимодействию с ними клеточных кальнексина и кальретикулина (рис. 5A–B).

Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе гликопротеиновых комплексов E1E2 в клетках насекомых Sf9 показал, что при нарушении одного из сайтов гликозилирования – N3, N4, N7 или N8 – формируется нековалентно связанный комплекс E1E2 так же, как и в случае экспрессии E2 дикого типа. Мутантные E2, лишённые сайтов N9 и N11, оказывают промежуточный эффект на сборку гликопротеинов оболочки ВГС. По мере увеличения числа поврежденных сайтов (N1–N7(mL) и N8–N11(mR)) взаимодействие гетеродимеров с кальнексином уменьшается, и сборка продуктивного комплекса E1E2 нарушается. Агрегаты неправильно свернутых димеров E1E2, образованные белком E2 с мутациями во всех сайтах гликозилирования, с кальнексином не взаимодействуют. Интересно, что сборка нековалентно связанного комплекса E1E2 нарушается также в результате повреждения одного из сайтов (N1, N2 или N10). Мутации именно этих сайтов гликозилирования E2, по-видимому, препятствуют образованию правильной конформации белков, образующих функциональный комплекс E1E2.

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на образование вирусоподобных частиц в клетках Sf9 и Hek293T

Показано, что синтез структурных белков С (core), E1 и E2 ВГС в клетках насекомых сопровождается образованием вирусоподобных частиц. Ранее мы показали, что синтезируемые в клетках насекомых рекомбинантные структурные белки ВГС, в том числе мутантный E1, встраиваются в мембраны ЭР, где происходит их сворачивание, образование комплекса E1E2 и формирование ВПЧ. Образование ВПЧ фиксировали во фракциях микросом, очищенных из клеток насекомых Sf9, инфицированных реком-

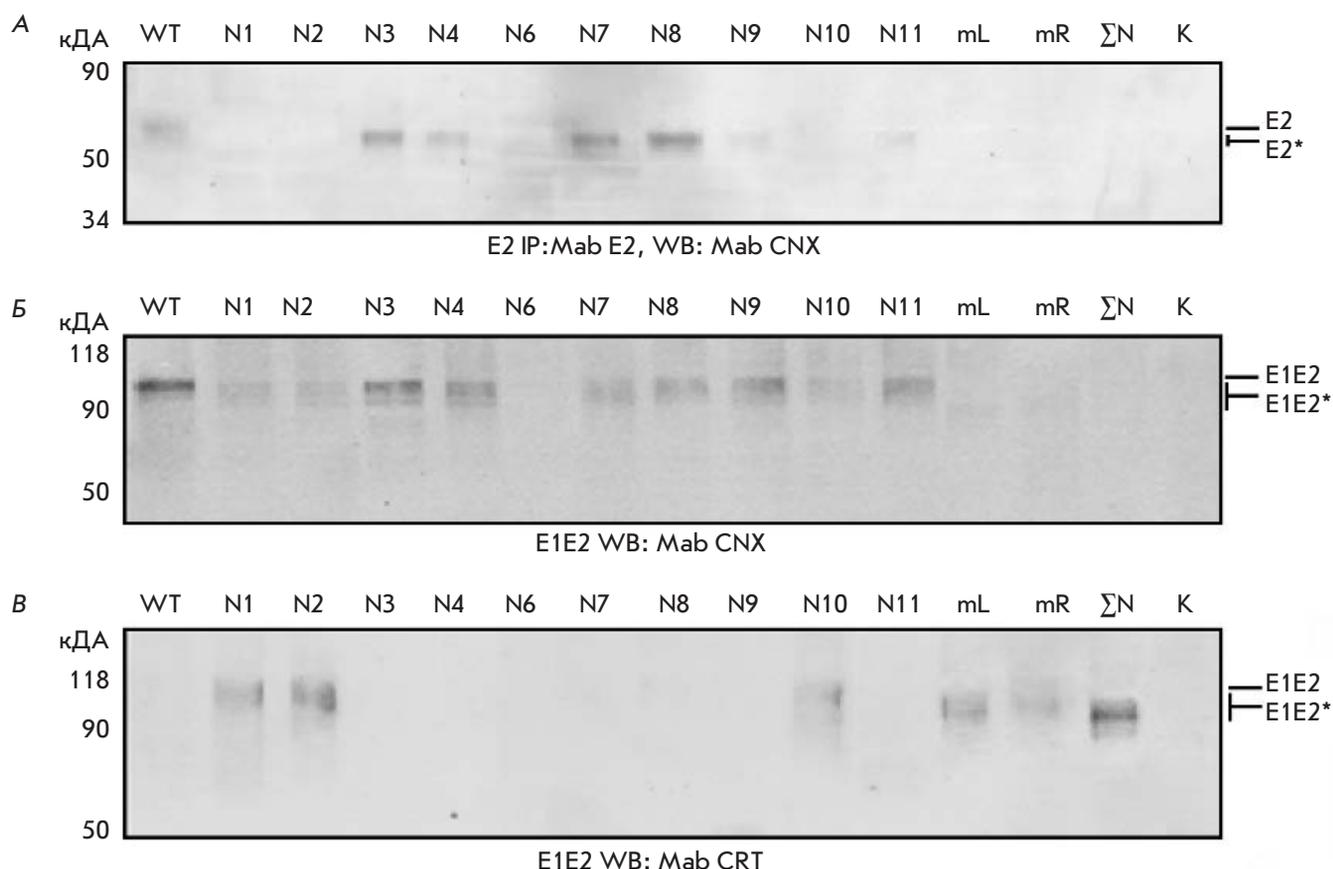


Рис. 5. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в клетках Sf9. А – вестерн-блоттинг в денатурирующем 12% ПААГ с антителами к кальнексину после предварительного иммуноосаждения антителами к гликопротеину E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами. WT – E2 дикого типа; N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1–N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в соответствующих сайтах гликозилирования; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; Б – вестерн-блоттинг в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к кальнексину и В – к кальретикулину. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующих E2 с мутациями в составе E1E2; К – отрицательный контроль (Hsp90); мутантные белки обозначены E2*

бинантными бакуловирусами, с помощью электронной микроскопии [20]. Мы обнаружили, что отсутствие гликанов в сайтах гликозилирования белка E1 не влияет на образование ВПЧ в клетках насекомых [23]. В данной работе анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе SE1E2 в клетках насекомых Sf9 показал, что нарушение сайтов гликозилирования в разных комбинациях (за исключением сайта N6) не влияет на их синтез, при этом электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования (рис. 6А).

Мутации, введенные в сайты гликозилирования N3, N4, N7, N8, N9, N11 E2, не препятствуют укладке гликопротеинов в составе SE1E2 ВГС в клетках Sf9. В то же время повреждение сайтов N1, N2 и N10 на-

рушает сборку, приводя к образованию непродуктивных гетеродимеров E1E2 и соответственно к их неправильной упаковке в составе ВПЧ (рис. 6Б,В). Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов не препятствует образованию ВПЧ ВГС в клетках насекомых, но, по всей видимости, приводит к образованию дефектных вирусных частиц, отличающихся от природных. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе SE1E2 в клетках HEK293T показал, что при образовании белков E2, лишенных одного из сайтов гликозилирования N4 или N8, не нарушается правильная упаковка гликопротеинов в составе SE1E2 ВГС, также как и в клетках Sf9. При этом по мере увеличения числа поврежденных сайтов гликозилирования N1–N7(mL) или N8–N11(mR) E2 взаимодействие образо-

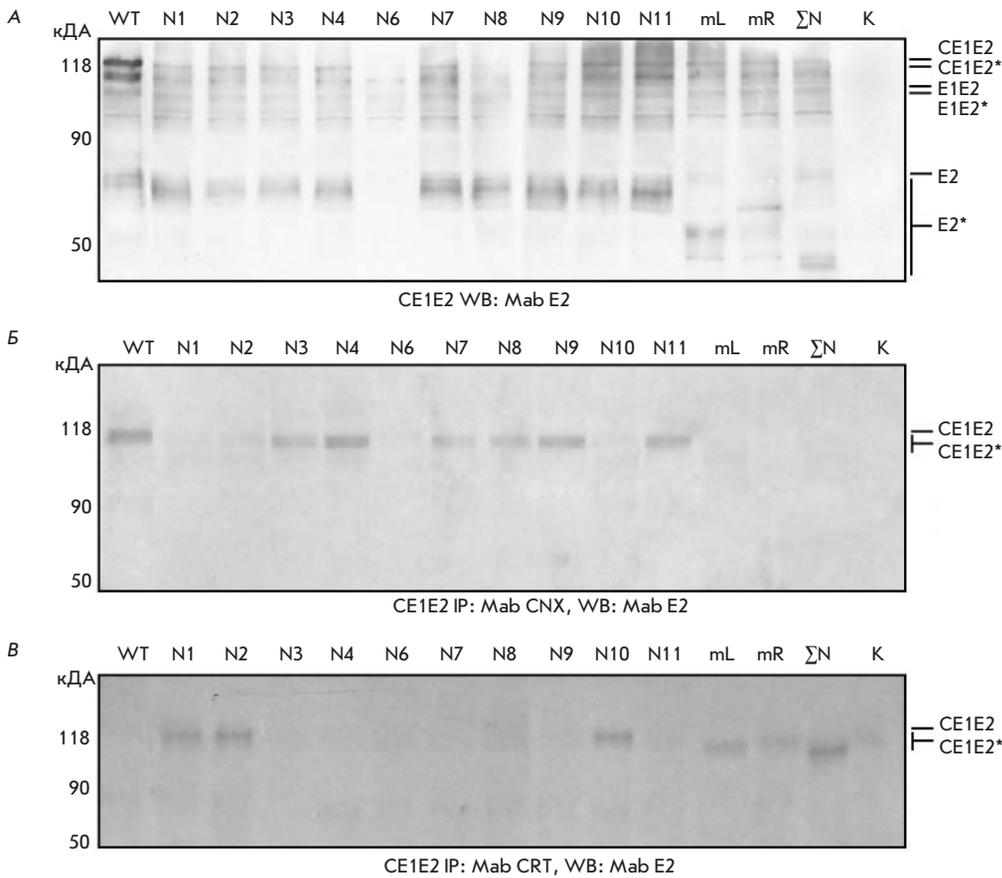


Рис. 6. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе CE1E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг в денатурирующем 8% ПААГ с антителами к E2 ВГС (А), с антителами к E2 ВГС после предварительного иммуноосаждения антителами к кальнексину (Б) и кальретикулину (В). Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующими E2 в составе CE1E2: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайте гликозилирования – N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1–N7(mL), N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; К – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

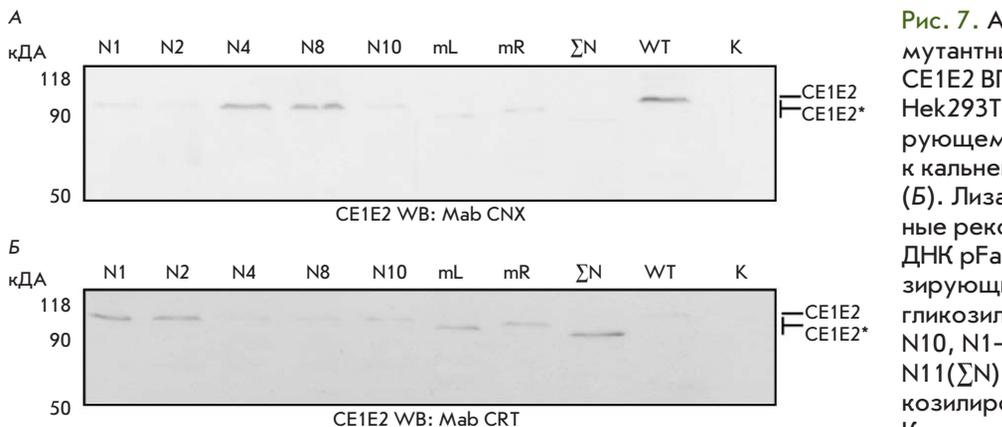


Рис. 7. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе CE1E2 ВГС в клетках млекопитающих HeK293T. Вестерн-блот в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к кальнексину (А) и кальретикулину (Б). Лизаты клеток, трансфицированные рекомбинантными плазмидными ДНК pFastBacMamCE1E2GFP, синтезирующими E2 с мутациями в сайте гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, N1–N7(mL), N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования; WT – E2 дикого типа; К – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

ванных гетеродимеров с кальнексином уменьшается, а с кальретикулином увеличивается. С кальретикулином взаимодействуют димеры, образованные E2 с мутациями во всех сайтах гликозилирования (ΣN). Интересно, что сборка продуктивного комплекса E1E2 и его упаковка в составе ВПЧ в клетках млекопитающих, как и в клетках насекомых, нарушается в результате повреждения сайтов гликозилирования N1, N2 и частично N10 E2 (рис. 7А,Б).

Отсутствие углеводных цепей в сайтах N1, N2 и в меньшей степени N10 гликопротеина E2, по-видимому, играет существенную роль в нарушении конформации белков функционального комплекса ВПЧ ВГС, препятствуя образованию в клетках полноценных вирусных частиц [24].

Ранее мы показали образование ВПЧ ВГС в клетках насекомых с помощью вестерн-блоттинга с антителами к ВГС и электронной микроскопии. Для опре-

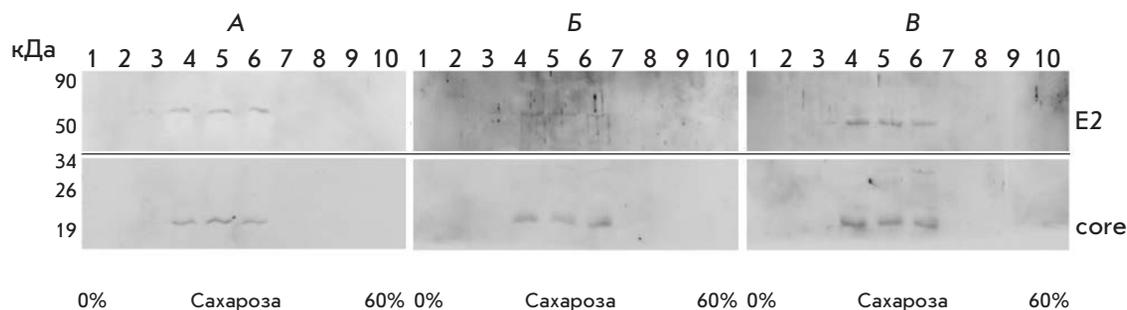


Рис. 8. Анализ вирусоподобных частиц ВГС, полученных в клетках Нек293Т, с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы. Вестерн-блотинг ВПЧ 10 фракций, начиная с верхней, в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к белкам С и E2 ВГС. Клетки Нек293Т трансфицированы рекомбинантными ДНК рFastBacMamCE1E2GFP. А – исходная ДНК; Б – ДНК с мутацией в сайте гликозилирования N1 E2; В – с мутациями во всех сайтах гликозилирования E2

деления биофизических характеристик ВПЧ ВГС, полученных в клетках млекопитающих, ВПЧ очищали и концентрировали центрифугированием через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g, а осадок ВПЧ анализировали с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы как описано в «Экспериментальной части». Собранные фракции анализировали с помощью вестерн-блотинга с антителами к структурным белкам (рис. 8А–В).

Иммуноблотинг с антителами к белкам С и E2 показал, что ВПЧ содержатся во фракциях с плотностью 1.14–1.16 г/см³, что может свидетельствовать о присутствии в них фрагментов РНК [25].

ОТ-ПЦР на суммарной РНК клеток насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bV-CE1E2mut с праймерами к генам белков С и E2 ВГС, выявляет фрагменты РНК структурных белков (результаты не представлены). Аналогичные результаты получены и для клеток Нек293Т. Таким образом, можно заключить, что N-гликаны гликопротеина E2 ВГС не влияют на синтез РНК структурных белков в клетках насекомых и млекопитающих и, возможно, на включение этих РНК в вирусоподобные частицы.

Влияние рецептора CD81 на связывание рекомбинантных ВПЧ ВГС с клетками гепатомы Нuh7.0

В настоящей работе мы изучали связывание ВПЧ ВГС, несущих мутантные белки E2, с клетками Нuh7.0. Клетки Нuh7.0, обработанные и не обработанные специфическими антителами к CD81, инкубировали с ВПЧ, полученными в клетках насекомых, и анализировали связывание мутантных белков E2 с клетками методом вестерн-блотинга (рис. 9). Предварительно была определена рабочая концентрация Ab CD81 (20 мкг/мл) [26].

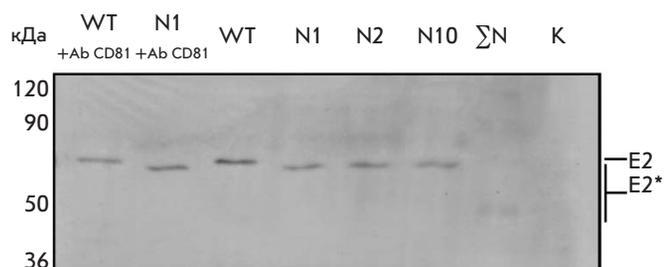


Рис. 9. Анализ связывания мутантных белков E2 в составе рекомбинантных ВПЧ ВГС с клетками Нuh7.0. Вестерн-блотинг мутантных белков E2 в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток Нuh7.0, обработанные и не обработанные антителами к CD81, после инкубации с рекомбинантными ВПЧ, синтезированными в клетках насекомых Sf9, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующими мутантные E2 в составе CE1E2mut: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайте гликозилирования N1, N2, N10; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; WT + Ab CD81, N1 + Ab CD81 – клетки, обработанные Ab CD81; WT, N1, N2, N10, ΣN – клетки, не обработанные Ab CD81; К – отрицательный контроль (Нuh7.0). Мутантные белки обозначены E2*

Показано, что образующиеся в клетках насекомых ВПЧ ВГС, содержащие мутантные варианты E2, связываются с клетками Нuh7.0 независимо от присутствия на их поверхности рецептора CD81. Helle F. и соавт. [26] показали, что вирусные частицы с мутантными белками E2 в своем составе, связываются с клетками НерG2, Нuh7.0 CD81-зависимым способом. Известно, что влияние рецептора CD81 на связывание вирусных частиц ВГС с различными клетками (НерG2, Нuh7.0, NKNT-3, Molt-4) проявляется по-разному [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что важным этапом морфогенеза вируса гепатита С, определяющим правильную сборку вириона, является гликозилирование белков оболочки вируса в инфицированной клетке. Нами показано, что синтезируемые в клетках насекомых и млекопитающих белки оболочки ВГС, в том числе белок Е2, содержащий мутации в сайтах гликозилирования, встраиваются в мембраны ЭР, где происходит их сворачивание, образование комплекса Е1Е2 и формирование вирусоподобной частицы. Исследование роли гликозилирования белков оболочки в морфогенезе вируса гепатита С генотип 1б (штамм 274933RU) показало, что нарушение единичных сайтов гликозилирования N1 и N8 белка Е2 ВГС (так же как N1 и N5 белка Е1 ВГС) ведет к снижению экспрессии этих белков в клетках млекопитающих, в отличие от экспрессии в клетках насекомых. Впервые обнаружено, что нарушение сайтов гликозилирования N1, N2 и N10 белка Е2 (как N1 и N5 белка Е1 ВГС) влияет на образование функциональных гетеродимеров Е1Е2. В отсутствие гликанов в этих положениях происходит в основном образование непродуктивных ди-

меров, но это не препятствует формированию вирусоподобных частиц ВГС как в клетках насекомых Sf9, так и в клетках человека Нек293Т. Высказано предположение, что образующиеся вирусоподобные частицы с неправильно свернутыми гликопротеинами являются дефектными, неспособными инфицировать клетки-мишени. Полученные данные свидетельствуют об образовании в клетках Sf9 и Нек293Т вирусоподобных частиц плотностью 1.14–1.16 г/см³, содержащих фрагменты РНК. Показано, что N-гликаны гликопротеинов ВГС не влияют на синтез РНК структурных белков в клетках насекомых и млекопитающих и, возможно, на их включение в вирусоподобные частицы. В настоящей работе мы показали, что вирусоподобные частицы ВГС, синтезирующиеся в клетках насекомых, связываются с клетками гепатомы Нuh7.0 независимым от рецептора CD81 образом. ●

Работа получила финансовую поддержку РФФИ (гранты № 07-04-12136, 08-04-00281, 011-04-00231) и Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.512.11.2266).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hnatyszyn H.J. // *Antivir. Ther.* 2005. V. 10. P. 1–11.
2. Baumert T.F., Ito S., Wong D.T., Liang T.J. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3827–3836.
3. Reed K.E., Rice C.M. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2000. V. 242. P. 55–84.
4. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. // *Успехи биохимии.* 2005. Т. 45. С. 37–86.
5. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. // *Science.* 1989. V. 244. P. 359–362.
6. Burda P., Aebi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1426. P. 239–257.
7. Choukhi A., Ung S., Wychowski C., Dubuisson J. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3851–3858.
8. Goffard A., Dubuisson J. // *Biochimie.* 2003. V. 85. P. 295–301.
9. Op de Beeck A., Cocquerel L., Dubuisson J. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 2589–2595.
10. Montreuil J., Vliegthart J.F., Schachter H. // *Glycoproteins.* Elsevier. 1995. P. 1–12.
11. Chapel C., Garcia C., Roingard Ph. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. P. 861–871.
12. Helle F., Goffard A., Morel V., Duverlie G., McKeating J., Keck Z.Y., Fong S., Penin F., Dubuisson J., Voisset C. // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 8101–8111.
13. Xiang J., Wunschmann S., George S.L., Klinzman D., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Stapleton J.T. // *J. Med. Virol.* 2002. V. 68. P. 537–543.
14. Brazzoli M., Helenius A., Fong S.K., Houghton M., Abrignani S., Merola M. // *Virol.* 2005. V. 332. P. 438–453.
15. Cocquerel L., Meunier J.C., Op de Beeck A., Bonte D., Wychowski C., Dubuisson J. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 1629–1635.
16. Мохонов В.В., Новиков Е.И., Самохвалов Е.И. // *Вопросы вирусологии.* 2002. Т. 47. С. 9–12.
17. Jones D.M., McLauchlan J. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 22733–22739.
18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982.
19. *Vac-to-Vac Baculovirus Expression System. Instruction Manual.* St. Louis, MO: Life Technologies, Inc., Monsanto Corp. Res. 1993.
20. Белжеларская С.Н., Королева Н.Н., Попенко В.В., Друца В.Л., Орлова О.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. С. 107–119.
21. Друца И.Л., Кабердин В.Р., Королева О.Н., Шилов И.О. // *Биоорг. химия.* 1991. Т. 17. С. 1487–1493.
22. Тимохова А.В., Бакиновский Л.В., Зинин А.И., Попенко В.И., Иванов А.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н., Белжеларская С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. № 4. С. 644–653.
23. Орлова О.В., Друца В.Л., Спиринов П.В., Попенко В.И., Прасолов В.С., Рубцов П.М., Кочетков С.Н., Белжеларская С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2013. Т. 47. № 1. С. 147–156.
24. Clayton R.F., Owsianka A., Aitken J., Graham S., Bhella D., Patel A.H. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 7672–7682.
25. McEwen C.R. // *Anal. Biochem.* 1967. V. 20. P. 114–149.
26. Helle F., Vieyres G., Elkrif L., Popescu C.I., Wychowski C., Descamps V., Castelain S., Roingard P., Duverlie G., Dubuisson J. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 11905–11915.
27. Tryatni M., Saunier B., Maruvada P., Davis A.R., Ulianich L., Heller T., Patel A., Kohn L.D., Liang T.J. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 9335–9344.

УДК 544.018.2

Новые нанобиокомпозитные материалы для биоэлектронных устройств

Д. В. Панкратов^{1,2,3}, Е. Гонзалез-Аррибас³, Ю. М. Парунова¹, М. А. Горбачева^{1,2},
Ю. С. Зейфман¹, С. В. Кузнецов⁴, А. В. Липкин¹, С. В. Шлеев^{1,2,3*}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

³Департамент биомедицинских исследований, Университет г. Мальмё, 20506, Мальмё, Швеция

⁴Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14

*E-mail: shleev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 12.11.2014

РЕФЕРАТ Разработаны и изготовлены нанобиокомпозитные материалы на основе графена, поли(3,4-этилендиокситиофена) и глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности наноматериалов различной природы (наночастицы золота и многостенные углеродные нанотрубки) и размера (нанотрубки различного диаметра). Сравнительное изучение возможного влияния природы наноматериала на биоэлектродокаталитические характеристики глюкозооксилирующих биоанодов в нейтральном фосфатном буферном растворе показало, что плотности биоэлектродокаталитических токов биоэлектродов на основе нанокомпозитов слабо зависят от размера наноматериала и в большей мере определяются его природой. Полученные нанобиокомпозиты являются перспективными материалами для новых биоэлектронных устройств из-за возможности легко варьировать емкостные и биоэлектродокаталитические характеристики, что позволяет использовать их для изготовления электродов с двойной функцией, а именно для одновременной генерации и накопления электрической мощности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глюкозооксидаза, графен, нанобиокомпозит, электропроводящий органический полимер, электрод с двойной функцией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ACN – ацетонитрил; GE – желатин; EDOT – 3,4-этилендиокситиофен; PEDOT – поли(3,4-этилендиокситиофен); PEG – полиэтиленгликоль; GA – глутаровый альдегид; TTF – тетратиафульвален; TCNQ – 7,7,8,8-тетрацианохинодиметан; THF – тетрагидрофуран; GOx – глюкозооксидаза; AuNP – наночастицы золота; GR – графен; CNT – углеродные нанотрубки; SCE – насыщенный каломельный электрод; SEM – сканирующая электронная микроскопия; Au – золотой электрод; CTC – комплекс с переносом заряда; PB – фосфатный буферный раствор; j – плотность биокаталитического тока; CV – циклическая вольтамперограмма.

ВВЕДЕНИЕ

Нанобиокомпозитные материалы находят все большее применение в различных областях науки и техники, в том числе и в новых биомедицинских технологиях [1]. Современные биоэлектронные устройства (биосенсоры, биотопливные элементы, биобатареи и т.п.), созданные на основе нанокомпозитных материалов, могут быть использованы для непрерывного мониторинга состояния организма, направленного воздействия на органы и ткани, а также для точечной доставки лекарственных препаратов. Сравнительные исследования особенностей функционирования на-

нобиокомпозитов в буферных растворах и сложных физиологических жидкостях человека служат основой для создания высокоэффективной и стабильной биоэлектроники для биомедицинского использования. В представленной работе созданы и изучены в условиях, близких к физиологическим, новые нанобиокомпозитные материалы на основе графена, поли(3,4-этилендиокситиофена) и глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности наноматериалов различной природы (наночастицы золота и многостенные углеродные нанотрубки) и размера (углеродные нанотрубки различного диаметра).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , LiClO_4 , цитрат натрия, ацетонитрил ($\geq 99.9\%$, ACN), толуол ($\geq 99.8\%$), желатин (GE), *D*-глюкоза, 3,4-этилендиокситиофен (EDOT), полиэтиленгликоль (PEG), 25% раствор глутарового альдегида (GA), тетратиафульвален (TTF), 7,7,8,8-тетрацианохинодиметан (TCNQ), тетрагидрофуран (THF), а также глюкозооксидаза (GOx) из *Aspergillus niger* получены из Sigma-Aldrich (США) и использовались без дополнительной очистки. Этанол (95%) и аргон куплены в компании Kemetyl AB (Швеция) и AGA Gas AB (Швеция) соответственно. Все растворы готовили на деионизированной воде (18 МОм · см), полученной с использованием системы PURELAB UHQ II из ELGA Labwater (Великобритания).

Для синтеза нанобиокомпозитов использовали наночастицы золота (AuNP) диаметром 20 нм и углеродные наноматериалы трех типов: графен (GR, толщина – 1.6 нм, менее трех углеродных слоев) и два типа многостенных углеродных нанотрубок (CNT): CNT₁ (внешний диаметр – 10–15 нм, внутренний диаметр – 2–6 нм, длина – 0.1–10 мкм) и CNT₂ (внешний диаметр – 20–30 нм, внутренний диаметр – 1–2 нм, длина – 0.5–2 мкм). GR был куплен в компании Graphene Supermarket (США), CNT – в Sigma-Aldrich. AuNP синтезированы с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя по методике, описанной в работе [2]. Раствор HAuCl_4 (50 мл, 250 мкМ) нагревали до кипения при постоянном перемешивании, затем добавляли 750 мкл водного раствора с массовой долей цитрата натрия 1%. После добавления цитрата натрия смесь выдерживали в течение 10 мин без нагревания при постоянном перемешивании. Полученную суспензию AuNP охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в 50 раз центрифугированием при 10000 г в течение 30 мин [3], при этом 98% супернатанта удалялось, концентрат AuNP объединяли и ресуспензировали ультразвуковой обработкой.

Электрохимические измерения осуществляли при помощи потенциостата/гальваностата $\mu\text{Autolab Type III/FRA2}$ от Metrohm Autolab B.V. (Нидерланды) с использованием трехэлектродной схемы с насыщенным каломельным электродом сравнения (SCE, 242 мВ относительно нормального водородного электрода) и платиновой проволокой в качестве вспомогательного электрода. Все значения потенциалов, представленные в работе, даны относительно SCE, если об этом не упомянуто специально.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ванны Ultrasonic Cleaner XB2 от VWR

International Ltd. (Великобритания). Сканирующую электронную микроскопию (SEM) проводили на микроскопе высокого разрешения EVO LS 10 от Zeiss (Германия).

Изготовление электродов на основе нанобиокомпозитных материалов

Поликристаллические золотые дисковые электроды (Au) от компании Bioanalytical Systems (США) с геометрической площадью поверхности 0.031 см² механически очищали полировкой на бумаге Microcloth (Buehler, Великобритания) в суспензии оксида алюминия с размером частиц 0.1 мкм, купленной в Struers (Дания). Далее электроды промывали деионизированной водой и подвергали ультразвуковой обработке в этаноле в течение 5 мин для удаления остаточных частиц оксида алюминия, а затем электрохимически очищали циклированием в 0.5 М H_2SO_4 в диапазоне потенциалов от –0.2 до +1.7 В в течение 20 циклов со скоростью развертки потенциала 0.1 В/с, промывали водой и высушивали в потоке воздуха.

Далее на поверхности Au синтезировали наноккомпозит поли(3,4-этилендиокситиофен)/графен (PEDOT/GR) потенциодинамическим циклированием в диапазоне от 200 до 1300 мВ (1 цикл при скорости развертки потенциала 100 мВ/с) в 0.1 М фосфатном буферном растворе (PB, pH 7.4), содержащем 20 мМ EDOT, 1 мМ PEG, 0.1 М LiClO_4 и GR в массовом соотношении с EDOT 1 : 5 [4]. До проведения электрополимеризации смесь подвергали обработке ультразвуком в течение 1 ч для получения устойчивой суспензии, после чего в течение 20 мин продували аргоном для удаления кислорода. Как видно из рис. 1А, полученный слой PEDOT/GR отличается достаточной однородностью с незначительными дефектами, заполненными полимером.

Затем на поверхности композитного материала PEDOT/GR синтезировали комплекс с переносом заряда (СТС) TCNQ/TTF – известный медиатор для обеспечения контакта между электродом и иммобилизованной GOx (см. ниже) [4]. TCNQ и TTF растворяли в THF и ACN соответственно для получения концентрации растворов 1.2 мг/мл. Растворы TCNQ (1 мкл) и TTF (2 мкл) смешивались на поверхности композита PEDOT/GR, избыток непрореагировавшего TTF смывали ACN по окончании процесса кристаллизации СТС. Полученные кристаллы СТС имеют характерную игольчатую форму, что согласуется с данными [5], однако достаточно неравномерно распределены по поверхности электрода, формируя островки, соответствующие центрам кристаллизации (рис. 1Б).

На поверхность комплекса TCNQ/TTF наносили 2 мкл суспензии наноматериала, CNT или AuNP.

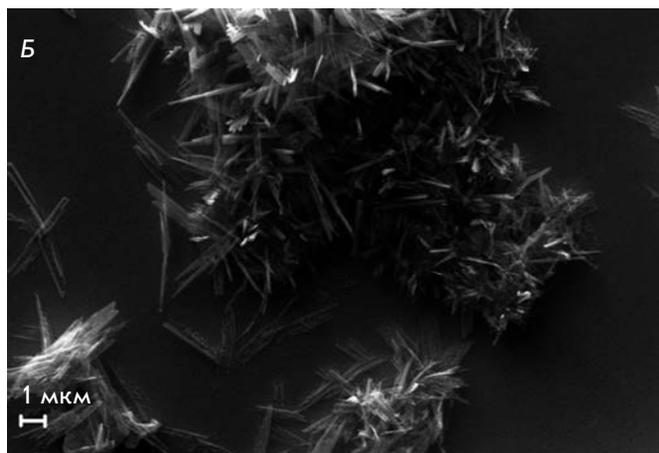
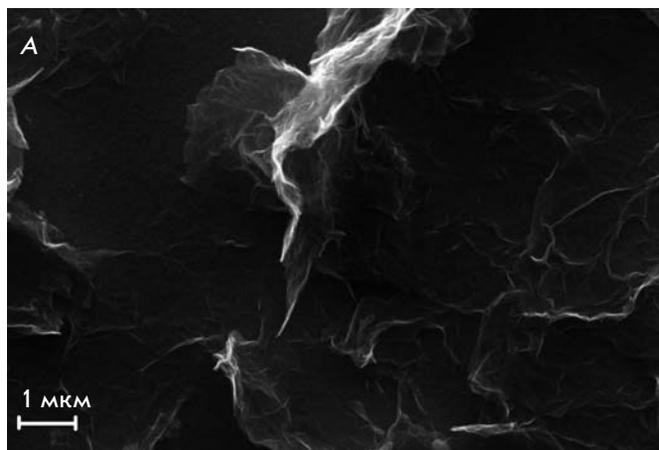


Рис. 1. SEM-изображения поверхности электрода Au|PEDOT/GR (А) и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF (Б)

Для получения устойчивой суспензии 1 мг CNT смешивали с 1 мл толуола, концентрат AuNP разводили деионизированной водой в 10 раз; полученные смеси подвергали ультразвуковой обработке в течение 20 мин.

Для биомодификации полученных наноконкомпозитов PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT и PEDOT/GR|TCNQ/TTF|AuNP 2 мкл раствора GOx (10 мг/мл в РВ) наносили на поверхность электрода и выдерживали при +4°C в течение 1 ч. Для оценки влияния наноматериала на биокаталитические свойства электрода был изготовлен биокомпозит PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx, в котором фермент был иммобилизован непосредственно на поверхности СТС. SEM-изображение поверхности нанобиоконкомпозита PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx представлено на рис. 2. Следует отметить развитую поверхность и достаточную однородность слоя CNT₁/GOx, равномерно покрывающего СТС.

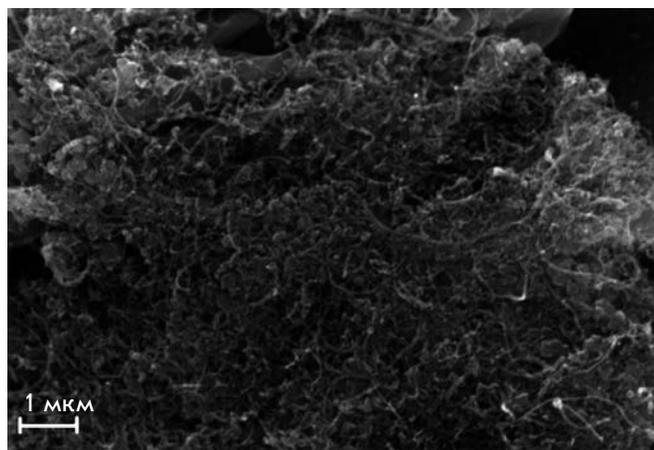


Рис. 2. SEM-изображение поверхности электрода Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx

Для стабилизации полученной структуры на поверхность электродов наносили 2 мл раствора желатина в воде (2.5 масс. %) с последующим высушиванием в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого электроды погружали в водный раствор GA (5 масс. %) на 60 с и промывали водой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биокаталитические свойства разработанных электродов изучали в 0.1 М РВ в интервале потенциалов от -0.2 до 0.2 В относительно SCE при скорости развертки 10 мВ/с. Циклические вольтамперограммы (CV) биоанодов различной структуры представлены на рис. 3.

Емкость полученных электродов не зависит от присутствия наноконкомпозита и находится в диапазоне 1.5–2.5 мФ/см² для всех типов структур. Следует отметить легкость изменения емкости нанобиоконкомпозитов как на этапе синтеза PEDOT/GR (количество циклов электрополимеризации), так и на этапе создания нанобиоконкомпозита. Данное свойство позволяет использовать разработанные материалы для создания и оптимизации гибридных биоэлектродов с двойной функцией – генерации и накопления электрической мощности [6].

Как видно из представленных данных, выраженный биоэлектрокаталитический отклик с начальным потенциалом электроокисления глюкозы около 0 В, возрастающий с повышением концентрации глюкозы до 50 мМ, был зафиксирован для всех использованных электродов в РВ, содержащем глюкозу, что согласуется с опубликованными для системы СТС/GOx данными [7].

Плотность биокаталитического тока (*j*) для электродов Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx|GE оказалась

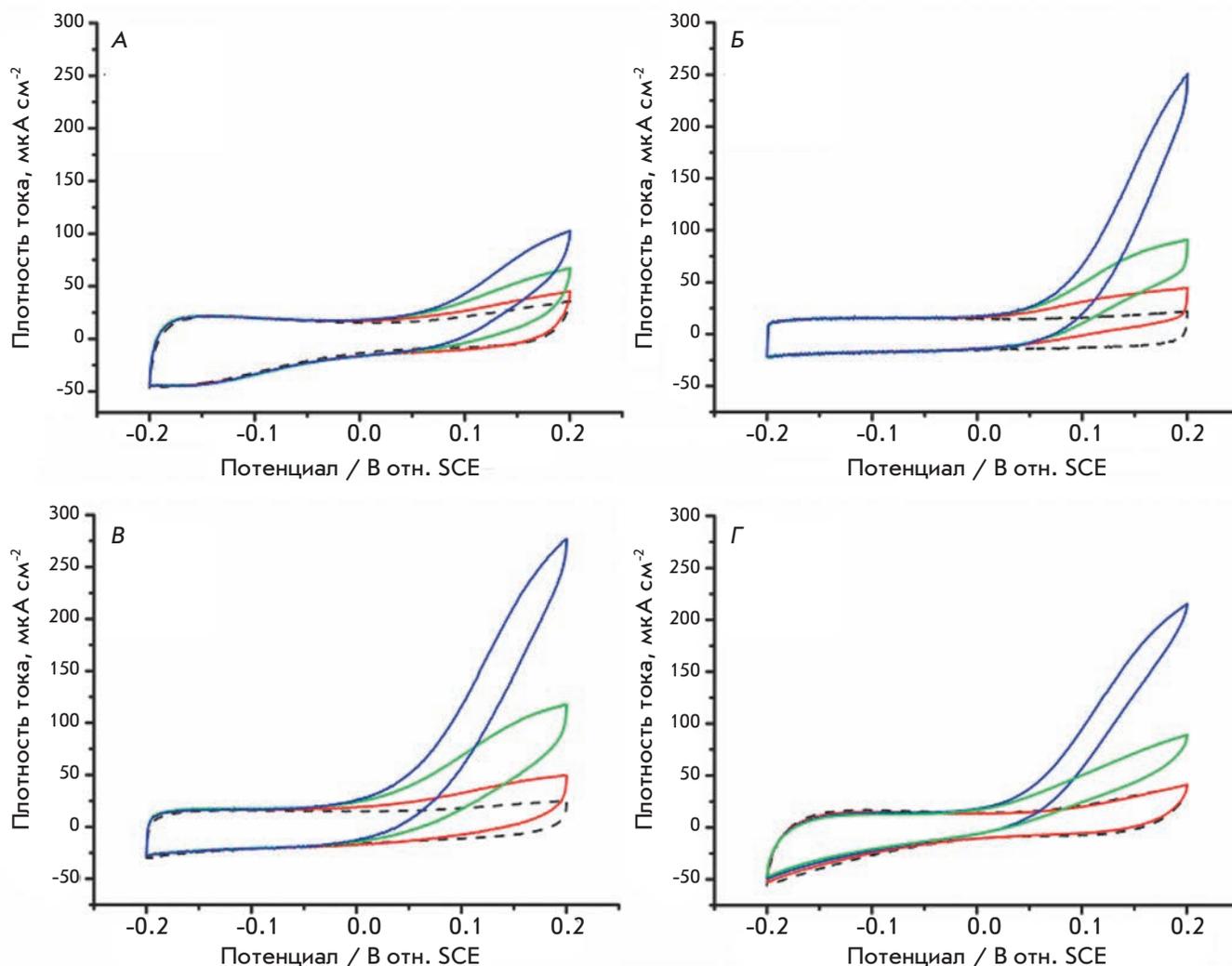


Рис. 3. CV биоанодов Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx|GE (А) и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|Наноматериал|GOx|GE (Б–Г) в РВ (пунктирная кривая) и РВ, содержащем глюкозу различной концентрации (сплошные кривые), ммоль/л: 0.05 (красная кривая), 5 (зеленая кривая) и 50 (синяя кривая). Наноматериал: CNT₁ (Б), CNT₂ (В), AuNP (Г)

минимальной (67 ± 4 мкА/см² при концентрации глюкозы 50 мМ и потенциале 0.2 В) по сравнению с образцами, содержащими наноматериал, что может быть связано с неравномерностью распределения СТС на поверхности электрода (рис. 1Б). При адсорбции фермента на поверхности СТС медиаторный электронный перенос блокируется для молекул GOx, адсорбированных на нанокompозите PEDOT/GR, в связи с чем снижается доля биоэлектрохимически активного фермента.

В случае электродов типа Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|Наноматериал|GOx|GE полученная величина j составила 229 ± 13 и 251 ± 15 мкА/см² при использовании в качестве наноматериала CNT₁ и CNT₂ соответственно и 175 ± 8 мкА/см² при использовании

AuNP в условиях, аналогичных условиям для биоанодов, не содержащих наноматериал. Величина j при использовании в качестве наноматериала CNT₂ примерно на 10% выше j для электродов, основанных на CNT₁, что соответствует разнице в емкости Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx|GE и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₂/GOx|GE (1.63 ± 0.05 и 1.85 ± 0.05 мФ/см² соответственно). Можно предположить, что увеличение j при использовании CNT₂ связано с большей удельной площадью поверхности, а не с лучшими условиями иммобилизации фермента. Это согласуется с данными, полученными ранее для билирубиноксидазы, адсорбированной на поверхности, модифицированной AuNP различного диаметра, превышающего размер фермента [8].

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований созданы многокомпонентные нанобиоконпозиты с возможностью контролируемой регуляции их емкостных и биоэлектрокаталитических параметров. Полученные материалы могут быть использованы для создания современных биоэлектронных

устройств, функционирующих в условиях, близких к физиологическим. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-14-00530).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanocomposites /Ed. C. S. S. R. Kumar. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. V. 8. 466 p.
2. Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. // Anal. Chem. 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221.
3. Wang X.J., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S. // Biosensors Bioelectronics. 2012. V. 31. № 1. P. 219–225.
4. Xiao X.X., Wang M.E., Li H., Si P.C. // Talanta. 2013. № 116. P. 1054–1059.
5. Sugimoto T., Tanaka H., de Caro D., Valade L. // Materials. 2010. V. 3. № 3. P. 1640–1673.
6. Pankratov D., Blum Z., Suyatin D.B., Popov V.O., Shleev S. // ChemElectroChem. 2014. V. 1. № 2. P. 343–346.
7. Khan G.F., Ohwa M., Wernet W. // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 17. P. 2939–2945.
8. Pankratov D.V., Zeifman Y.S., Dudareva A.V., Pankratova G.K., Khlopova M.E., Parunova Y.M., Zajtsev D.N., Bashirova N.F., Popov V.O., Shleev S.V. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 1. P. 102–106.

УДК 615.371

Избирательная протективность $\Delta nlpD$ -мутантов *Yersinia pestis*

С. В. Дентовская¹, С. А. Иванов¹, П. Х. Копылов¹, Р. З. Шайхутдинова¹, М. Е. Платонов¹,
Т. И. Комбарова¹, Т. В. Гапельченкова¹, С. В. Балахонов², А. П. Анисимов^{1*}

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., Серпуховской район, Оболенск

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока
Роспотребнадзора, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78

*E-mail: anisimov@obolensk.org, a-p-anisimov@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.06.2014

РЕФЕРАТ Мутация по гену *nlpD* приводит, как показано недавно, к полной аттенуации *Yersinia pestis*, а *nlpD*-мутант превосходит вакцинный штамм EV76 по способности защищать мышей от гибели при заражении бубонной или легочной формой чумы [PLoS One. 2009. V. 4. № 9. e7023]. В представленной работе аналогичные $\Delta nlpD$ -мутанты сконструированы на основе других родительских штаммов *Y. pestis*, включая непатогенные для морских свинок и человека штаммы подвида *microtus*. Проведение сравнительной оценки подтвердило, что при подкожной иммунизации мышей $\Delta nlpD$ -мутанты индуцировали иммунный ответ, в 10^5 раз превосходящий по напряженности ответ на введение вакцинного штамма EV. В то же время варианты $\Delta nlpD$ -бактерий практически не защищали морских свинок от подкожного заражения возбудителем чумы, уступая штамму EV по напряженности формируемого иммунитета в 10^6 раз. Обсуждаются возможные причины выявленного феномена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Yersinia pestis*, $\Delta nlpD$ -мутант, избирательная протективность, чумная живая вакцина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИИ – индекс иммунитета; ИФА – иммуноферментный анализ; КОЕ – колониеобразующая единица; ЛПС – липополисахарид; DCL (LD_{100}) – абсолютная летальная доза (*dosis certa letalis*); ImD_{50} – иммунизирующая доза, предохраняющая от гибели 50% зараженных животных; LD_{50} – доза, летальная для 50% зараженных животных.

ВВЕДЕНИЕ

Живые вакцины стимулируют не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета, играющее ведущую роль в иммуногенезе чумы у некоторых видов животных [1–8]. Кроме того, живые вакцины, сконструированные на основе аттенуированных штаммов, содержат не только один-два иммунодоминантных антигена, а целый спектр сложных (комплексы белков с липополисахаридами (ЛПС) и т.п.), конформационно-лабильных и минорных антигенов, что обеспечивает индукцию «гетерогенного» иммунного ответа после однократной иммунизации. Этот иммунный ответ способен защитить животных различных видов от патогенных бактерий даже с частично измененной антигенной специфичностью как при подкожном, так и аэрозольном заражении [3, 7–11]. Однако коммерческая живая чумная вакцина, созданная на основе штамма EV *Yersinia pestis*, способна независимо от путей введения вызывать различные по тяжести местные и системные побочные реакции у 5–29% лиц с нормальным иммунным статусом [1, 2,

12, 13]. Поэтому исследования, направленные на создание живых чумных вакцин на основе прецизионно аттенуированных штаммов *Y. pestis*, превосходящих используемый в коммерческой вакцине штамм EV по иммуногенности и обладающих сниженной реактогенностью, сохраняют свою актуальность до настоящего времени [2, 8, 14–19].

Потенциальные гены-мишени для аттенуации вирулентных штаммов отбирают с помощью произвольного мутагенеза индивидуально меченными транспозонами [20], с использованием методик обратной (реверсивной) вакцинологии [21–23] или исследуют аналоги генов других бактериальных патогенов, мутации в которых ведут к снижению вирулентности [24]. Так, в последнее десятилетие установлена взаимосвязь экспрессии генов семейства *nlpD/lppB* (novel lipoprotein D / lipoprotein B) с выживанием некоторых грамотрицательных бактерий в стрессовых условиях и их патогенностью [18, 25, 26]. Показано [14], что липопротеин NlpD необходим и для вирулентности возбудителя чумы *Y. pestis* при под-

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов

Штамм	Характеристика	Источник получения и/или ссылка*
<i>Y. pestis</i>		
EV линии НИИЭГ	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Δpgm вакцинный штамм (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>orientalis</i>)	ГКПМ-Оболениск
231	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>)	ГКПМ-Оболениск
231ΔnlpD	ΔnlpD вариант 231	НИ
И-3455	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>microtus</i> , bv. <i>altaica</i>)**	МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ
И-3455ΔnlpD	ΔnlpD вариант И-3455	НИ
И-2359	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>microtus</i> , bv. <i>altaica</i>)	МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ
И-2359ΔnlpD	ΔnlpD вариант И-2359	НИ
<i>E. coli</i>		
ДН5α lpir	F ⁻ , λ ⁻ , recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, recA1	[27]
S17-1 lpir	thi pro hsdR ⁻ hsdM ⁺ recA RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp ^R Sm ^R Pm ^S)	[28]

* ГКПМ-Оболениск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур на базе «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ – музей живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора.

**Использованы наименования подвидов и биоваров *Y. pestis*, предложенные в [29].

кожном и аэрогенном способе введения. Более того, при иммунизации мышей 10⁵ КОЕ ΔnlpD-мутанта штамма *Y. pestis* Kimberley53 с последующим введением 10⁵ LD₅₀ вирулентного штамма Kimberley53 (1 LD₅₀ = 1–3 КОЕ) выжило 100% мышей, а вакцинный штамм EV76 защитил от гибели только 10% животных.

Цель настоящей работы состояла в конструировании ΔnlpD-мутантов на основе других родительских штаммов *Y. pestis*, включая непатогенные для морских свинок и человека штаммы подвида *microtus*, и оценке их иммуногенности в отношении мышей и морских свинок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, использованные в работе, и их характеристика представлены в табл. 1. Штаммы *Y. pestis* и *Escherichia coli* культивировали на жидких или плотных питательных средах Хоттингера (различные серии лабораторного приготовления ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии) и LB (триптон – 1%, дрожжевой экстракт – 0.5%, натрий хлористый – 1%), pH 7.2. Селекцию клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды, вели на средах с добавлением антибиотиков: ампициллин – 100 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл. Штаммы *Y. pestis* для иммунизации и заражения животных выращивали при температуре 28°C в течение 48 ч.

Мутагенез

Конструирование мутантных штаммов *Y. pestis* проводили путем гомологичной рекомбинации с помощью рекомбинантной плазмиды pCVD442-ΔnlpD::cat на основе суицидного вектора pCVD442 [30], в которой часть клонированной кодирующей последовательности гена nlpD (нуклеотиды 112–318) заменили геном cat из плазмиды pKD3 [31] (рисунки).

Плазмиду pCVD442-ΔnlpD::cat из донорного штамма *E. coli* S17-1 lpir переносили в штаммы-реципиенты *Y. pestis* (231, И-3455 и И-2359) методом конъюгации. Элиминацию суицидного вектора и селективный отбор клонов *Y. pestis* осуществляли в присутствии 5% сахарозы и хлорамфеникола [30]. Ген устойчивости к хлорамфениколу удаляли с помощью плазмиды pCP20 [31] (рисунки). Плазмиду pCP20 удаляли путем культивирования бактерий при температуре 40°C в среде, содержащей 2.5 мМ хлорида кальция, в течение ночи. Отбирали клоны, потерявшие устойчивость как к ампициллину (100 мкг/мл), так и к хлорамфениколу (20 мкг/мл). Правильность рекомбинации контролировали методом полимеразной цепной реакции.

Бактериоскопия и бактериологические исследования

Бактериоскопическое исследование, скорость роста и лизис культур чумным бактериофагом Л-413С, а также фибринолитическую и плазмокоагулазную

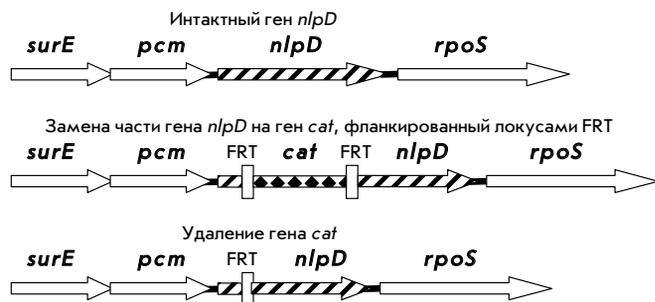


Схема конструирования $\Delta nlpD$ -мутантов *Y. pestis*. Детальное описание стратегии приведено в [30, 31]

активности, способность к пигментосорбции и плазмидный профиль определяли согласно [14, 32–34].

Иммунохимические исследования

Титры F1, продуцируемого испытываемыми штаммами *Y. pestis*, определяли в реакции непрямой геммагглютинации согласно [35].

Титры антител к антигенам F1 и LcrV в сыворотках животных, иммунизированных для оценки напряженности иммунитета (см. ниже), определяли с помощью непрямого варианта ИФА на 21-е сут после подкожного введения испытываемых и контрольного штаммов. Титры антител определяли индивидуально у пяти животных, произвольно отобранных в каждой группе из 40, иммунизированных одним из опытных или контрольным штаммом, с последующим определением среднего титра в группе. За величину титра принимали наибольшее разведение специфической антисыворотки, которому соответствовала оптическая плотность растворов субстрата при длине волны 492 нм, превосходящая на 0.1 значение контроля в этом же разведении [36]. На практике вычисляли разность контрольных и опытных значений A_{492} и строили графики зависимости полученной величины от соответствующих разведений антисывороток, которые аппроксимировали с использованием полиномиальной функции.

Определение безвредности штаммов *Y. pestis*

Безвредность испытываемых штаммов *Y. pestis* для мышей линии BALB/c, а также морских свинок оценивали по методикам, приведенным в [35]. Культуры исследуемых штаммов чумного микроба вводили подкожно мышам массой 18–20 г в дозе 10^2 , 10^3 , 10^5 и 10^7 КОЕ (по 10 мышей на каждую дозу) и пяти морским свинкам массой 180–200 г по 1.5×10^{10} КОЕ.

Оценку иммуногенной активности кандидатных вакцинных препаратов проводили в соответствии

с Методическими указаниями [35]. Иммуногенность сконструированных штаммов оценивали по величине ImD_{50} . Морских свинок (10 животных на группу) иммунизировали подкожно в область верхней трети правого бедра двухсуточной агаровой культурой исследуемого штамма в дозах 4×10^2 , 2×10^3 , 1×10^3 и 5×10^3 КОЕ в объеме 0.5 мл. Мышей линии BALB/c (10 животных на группу) также иммунизировали подкожно дозами 2×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 и 2.5×10^4 КОЕ в объеме 0.2 мл. Животных заражали на 21-е сут после иммунизации подкожно в область верхней трети левого бедра в дозе, соответствующей 200 DCL (LD_{100}) вирулентного штамма чумного микроба (в наших опытах 1 DCL соответствовала 10 КОЕ для мышей и 100 КОЕ для морских свинок). Наблюдение за зараженными животными продолжали в течение 20 сут. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом.

Напряженность иммунитета, т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от гибели на 21-е сут после иммунизации при заражении массивными дозами вирулентной культуры, определяли по формуле:

$$ИИ = \frac{LD_{50\text{имм}}}{LD_{50\text{инт}}}, \quad (1)$$

где ИИ – индекс иммунитета; $LD_{50\text{имм}}$ – LD_{50} для животных, иммунизированных исследуемым препаратом, КОЕ; $LD_{50\text{инт}}$ – LD_{50} для интактных животных, КОЕ [35].

Для определения напряженности иммунитета животных иммунизировали подкожно двухсуточными агаровыми культурами испытываемых и контрольного штаммов (по 40 морских свинок и 40 мышей на один штамм): морских свинок в дозе 5×10^3 КОЕ в объеме 0.5 мл, мышей линии BALB/c – 10^4 КОЕ в объеме 0.2 мл. На 21-е сут после иммунизации животных заражали культурой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 в четырех дозах: 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 КОЕ (морских свинок в объеме 0.5 мл, мышей – в объеме 0.2 мл). Одновременно заражали интактных (контрольных) животных в дозах 1, 5, 25 и 125 КОЕ в том же объеме, как и иммунизированных. Наблюдения за зараженными животными проводили в течение 20 сут. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом.

Статистические методы

Величины ImD_{50} мутантных по гену *nlpD* штаммов и LD_{50} вирулентного штамма, полученную на иммунизированных и интактных животных, а также доверительные интервалы (для вероятности 95%) определяли по методу Kärber [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование и характеристика NlpD⁻-вариантов вирулентных штаммов *Y. pestis*

Сайт-направленным мутагенезом гена *nlpD* в штаммах *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и двух штаммах подвида *microtus* bv. *altaica* И-3455 и И-2359 с последующим удалением маркера устойчивости к хлорамфениколу получили мутанты 231Δ*nlpD*, И-2359Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD* без генов антибиотикоустойчивости.

При бактериоскопическом исследовании окрашенных по Граму мазков, приготовленных из штаммов 231Δ*nlpD*, И-2359Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD*, установили, что культивирование мутантных штаммов при температуре 28°C вело к формированию неразделенных цепей, включающих в среднем 8.2 ± 3.6 клетки/цепь, в то время как исходные культуры *Y. pestis* 231, И-2359 и И-3455 формировали агрегаты из отдельных клеток. Повышение температуры культивирования до 37°C снижало число клеток Δ*nlpD*-мутантов в цепи до 4 ± 2.5 . Морфология клеток и клеточных скоплений исходных штаммов не зависела от температуры культивирования. Скорость роста *Y. pestis* 231Δ*nlpD* была такой же, как у исходного штамма при 28 и 37°C.

Сконструированные Δ*nlpD*-мутанты лизировались чумным бактериофагом Л-413С. Содержание капсульного антигена F1 в клетках мутантов по данным реакции непрямой гемагглютинации в 4–16 раз превышало аналогичный показатель, полученный на культуре вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенной в аналогичных условиях (1–4 мкг/10⁹ КОЕ и 0.25 мкг/10⁹ КОЕ соответственно). Эти Δ*nlpD*-мутанты не уступали штамму EV по фибринолитической и плазмокоагуляционной активностям.

Как и вакцинный штамм, они содержали три плазмиды pFra, pCad и pPst, но отличались от *Y. pestis* EV способностью к пигментосорбции.

Определение безвредности штаммов

Все дефектные по гену *nlpD* штаммы *Y. pestis*: 231Δ*nlpD*, И-3455Δ*nlpD* и И-2359Δ*nlpD*, так же как и вакцинный штамм *Y. pestis* EV, были авирулентны при подкожном введении мышам линии BALB/c (100% выживших при заражении дозой 10², 10³, 10⁵ и 10⁷ КОЕ) и морским свинкам (100% выживших при дозе 1.5×10^{10} КОЕ). Наблюдение проводили в течение 50 сут.

Антительный ответ к кандидатам в вакцинные штаммы

Образование антител к F1 и LcrV *Y. pestis* в крови мышей линии BALB/c определяли на 21-е сут после подкожной иммунизации исследуемыми штаммами *Y. pestis* в дозе 10⁴ КОЕ (табл. 2). Средние титры антител против F1 и LcrV в сыворотках мышей после вакцинации культурами *Y. pestis* 231Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD* превышали показатели, полученные для *Y. pestis* И-2359Δ*nlpD* и вакцинного штамма EV ($p < 0.05$).

Титры анти-F1- и анти-LcrV-антител в крови вакцинированных и контрольных морских свинок определяли на 21-е сут после подкожной иммунизации исследуемыми штаммами *Y. pestis* в дозе 5×10^4 КОЕ (табл. 2). По нашим данным средние титры антител против F1 и LcrV в сыворотках морских свинок после введения вакцинного штамма *Y. pestis* EV на два-три порядка превышали показатели для штаммов 231Δ*nlpD*, И-3455Δ*nlpD* и И-2359Δ*nlpD* ($p < 0.05$). Антительный ответ к F1 и LcrV *Y. pestis* у морских свинок после введения вакцинного и сконструирован-

Таблица 2. Антительный ответ на введение штаммов *Y. pestis* по результатам ИФА

Средние титры IgG (обратные значения)				
Штамм	231Δ <i>nlpD</i>	И-3455Δ <i>nlpD</i>	И-2359Δ <i>nlpD</i>	EV НИИЭГ
Морские свинки				
Антиген				
F1	4435 ± 1625	2650 ± 1045	130 ± 80	127630 ± 52830
LcrV	1555 ± 840	710 ± 260	920 ± 630	94390 ± 49290
Мыши				
Антиген				
F1	942560 ± 16620	9140 ± 1590	550 ± 95	310 ± 140
LcrV	2465 ± 970	6715 ± 1620	1580 ± 850	235 ± 85

Таблица 3. Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета у мышей линии BALB/c, вакцинированных $\Delta nlpD$ -вариантами штаммов *Y. pestis* 231, И-3455 и И-2359

Иммунизирующий штамм <i>Y. pestis</i>	ImD ₅₀ , КОЕ	Напряженность иммунитета	
		LD ₅₀ при заражении штаммом <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	ИИ
231 $\Delta nlpD$	1.3×10^2 ($5.3 \times 10 \div 3.4 \times 10^2$)	3.9×10^8 (слишком велик)	7.1×10^7
И-3455 $\Delta nlpD$	2.9×10^2 ($1.2 \times 10^2 \div 7.5 \times 10^2$)	2.5×10^7 ($1 \times 10^7 \div 3.9 \times 10^8$)	4.5×10^7
И-2359 $\Delta nlpD$	1.1×10^4 ($4.4 \times 10^3 \div 2.8 \times 10^4$)	2.5×10^3 ($6.3 \times 10^2 \div 3.9 \times 10^3$)	4.5×10^2
EV НИИЭГ	7.5×10^3 ($2.4 \times 10^3 \div 5.9 \times 10^4$)	1.0×10^3 ($2.5 \times 10^2 \div 3.9 \times 10^3$)	1.8×10^2

Таблица 4. Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета для морских свинок, вакцинированных $\Delta nlpD$ -вариантами штаммов *Y. pestis* 231, И-3455 и И-2359

Иммунизирующий штамм <i>Y. pestis</i>	ImD ₅₀ , КОЕ	Напряженность иммунитета	
		LD ₅₀ при заражении штаммом <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	ИИ
231 $\Delta nlpD$	9.1×10^3 (слишком велик)	63 ($1.6 \times 10 \div 2.5 \times 10^2$)	3.7
И-3455 $\Delta nlpD$	4.3×10^3 (слишком велик)	158 ($4.0 \times 10 \div 6.3 \times 10^2$)	9.3
И-2359 $\Delta nlpD$	1.1×10^5 (слишком велик)	10 ($3 \div 4.0 \times 10$)	0.59
EV НИИЭГ	65 ($1.6 \times 10 \div 2.6 \times 10^2$)	1.6×10^8 (слишком велик)	9.4×10^6

ных нами штаммов варьировал, у мышей ответ был более однородным.

При этом уровень циркулирующих анти-F1 и анти-LcrV в крови мышей, иммунизированных кандидатами в вакцинные штаммы *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$, значительно превышал показатели для морских свинок, иммунизированных теми же штаммами.

В контрольных группах после введения изотонического раствора хлорида натрия антител к F1 и LcrV *Y. pestis* не обнаружили.

Протективная эффективность кандидатов в вакцинные штаммы

Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета у однократно иммунизированных мышей линии BALB/c представлены в табл. 3. У лабораторных животных данного вида ImD₅₀ штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$ была в 58 и 26 раз ниже, чем у вакцинного штамма *Y. pestis* EV

соответственно, а у штамма И-2359 $\Delta nlpD$ – выше в 1.5 раза. Индекс иммунитета штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$ был на пять порядков выше, чем у вакцинного штамма *Y. pestis* EV, а штамма И-2359 $\Delta nlpD$ – в 2.5 раза.

Обратную картину наблюдали при использовании морских свинок в качестве модели для оценки иммуногенности и напряженности иммунитета (табл. 4). ImD₅₀ вакцинного штамма EV ниже, чем у штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$, И-3455 $\Delta nlpD$ и И-2359 $\Delta nlpD$ в 140, 66 и 1692 раза соответственно. Индекс иммунитета вакцинного штамма EV был на шесть порядков выше, чем у штаммов 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$, и на семь порядков выше, чем у штамма И-2359 $\Delta nlpD$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки универсальности сочетания аттенуации и высокой иммуногенности у $\Delta nlpD$ -вариантов *Y. pestis* проводили сайт-направленный мутаге-

нез трех штаммов возбудителя чумы дикого типа: один – подвида *pestis* bv. *antiqua* 231, два штамма подвида *microtus* bv. *altaica* И-3455 и И-2359. Известно, что штаммы подвида *microtus*, к которому принадлежит биовар *altaica* [29], вирулентны для мышей, но авирулентны для морских свинок, кроликов и человека [38, 39]. Предполагают [40], что штаммы подвида *microtus*, обладающие всеми протективными антигенами и авирулентные для людей, могут служить основой для создания живых чумных вакцин. Кроме того, один из использованных нами штаммов bv. *altaica* И-3455 продуцирует LcrV с повышенной иммуногенной/протективной активностью (за счет замены триптофана в позиции 113 на глицин) [41].

В Российской Федерации все испытания аттенуированных штаммов *Y. pestis*, перспективных в качестве вакцинных, проводят, сравнивая их с эталонным вакцинным штаммом чумного микроба EV линии НИИЭГ. Согласно [35] «штамм, предлагаемый в качестве вакцинного, должен соответствовать или превосходить эталонный вакцинный по показателю иммуногенности, соответствовать контрольному штамму по показателям безвредности и реактогенности или быть более безопасным, а по некоторым несущественным характеристикам, которые характеризуют его как представителя вида или разновидности *Y. pestis*, могут отличаться от него». «Несущественные характеристики» подразумевают, что «исследуемый штамм – кандидат в вакцинные должен:

- лизироваться чумным бактериофагом Л-413С;
- быть типичным по культурально-морфологическим свойствам;
- титр F1 испытуемого штамма не должен быть меньше аналогичного показателя, полученного с культурой контрольного штамма *Y. pestis* EV, выращенного в аналогичных условиях;
- доля кальцийнезависимых мутантов в популяции культур чумного микроба, пропассированных через организм лабораторных животных и не подвергавшихся длительному хранению или каким-либо физическим воздействием, не должна превышать 0.3%;
- не должен уступать контрольному штамму по фибринолизин-плазмокоагулазной активности;
- испытуемый и контрольные штаммы не должны обладать способностью к пигментосорбции;
- испытуемые вакцинные штаммы подобно эталонному штамму EV на электрофореграмме должны иметь три полосы плазмидной ДНК, соответствующие pFra (60 MD), pCad (47 MD) и pPst (6 MD)». Первая из плазмид кодирует основной иммуноген *Y. pestis* – капсульный антиген F1. Вторая – систему,

позволяющую внеклеточно расположенным бактериям обезвреживать клетки, участвующие в иммунном ответе хозяина, – вирулон Yop и входящий в эту систему второй иммунодоминантный антиген LcrV, а третья – активатор плазминогена, ответственный за диссеминацию чумного микроба в тканях хозяина [13].

По большинству несущественных показателей сконструированные нами $\Delta nlpD$ -штаммы *Y. pestis* соответствовали требованиям к вакцинным штаммам чумного микроба [35]. Они лизировались бактериофагом Л-413С, продукция F1 в клетках мутантов была в 2–4 раза больше, чем в клетках штамма EV, фибринолитическая и плазмокоагулазная активности у всех штаммов были на одном уровне, все штаммы содержали полный набор из трех классических плазмид чумного микроба.

Культурально-морфологические свойства $\Delta nlpD$ -мутантов штаммов 231, И-3455 и И-2359, рост в виде цепочек, отличающий их от бактерий дикого типа и вакцинного штамма EV, совпали с аналогичными данными [14], свидетельствующими о том, что липопротеин NlpD возбудителя чумы играет важную роль в процессе клеточного деления. Возможно, именно особенности клеточного деления являются основной причиной аттенуации $\Delta nlpD$ -мутантов.

Способность к пигментосорбции сохранилась у сконструированных штаммов на уровне штаммов дикого типа, так как их аттенуация была вызвана не делецией локуса *pgm*, а удалением структурного гена *nlpD*.

Что же касается соответствия $\Delta nlpD$ -мутантов основным критериям отбора вакцинных штаммов *Y. pestis*, то по степени аттенуации (безвредности) для мышей и морских свинок штаммы NlpD⁻ не уступали вакцинному штамму EV. Со вторым критерием, иммуногенностью, все оказалось не столь однозначно. Этот показатель оценивали на двух видах животных в трех независимых тестах: определяли титры антител к F1 и LcrV, рассчитывали иммунизирующие дозы, предохранявшие от гибели 50% зараженных животных, и индексы иммунитета.

Хотя уровни продуцируемых антител лишь частично коррелируют с протективной эффективностью чумных вакцин, гуморальный иммунитет играет важную роль в защите против чумы [42]. Полученные данные свидетельствуют о развитии эффективного иммунного ответа у мышей после введения аттенуированных культур чумного микроба, причем $\Delta nlpD$ -штаммы статистически значимо превосходили по этому показателю вакцинный штамм EV. В опытах на морских свинках картина была обратной – вакцинный штамм превосходил $\Delta nlpD$ -мутанты по способности индуцировать антителогенез.

На мышинной модели штаммы *Y. pestis* 231 Δ *nlpD* и И-3455 Δ *nlpD* статистически значимо превосходили штамм EV по величинам ImD₅₀ и особенно ИИ. В опытах же на морских свинках экспериментальные штаммы уступали вакцинному, причем напряженность иммунитета у животных, иммунизированных Δ *nlpD*-мутантами, стремилась к 1, т.е. практически не отличалась от этого показателя у неиммунных животных.

Результаты наших экспериментов подтверждают данные других исследователей о том, что реакция различных видов животных на один и тот же антиген/вакцинный препарат неодинакова [12, 43–48]. Отличия в протективности NlpD⁻-вариантов штаммов *Y. pestis* в отношении морских свинок и мышей, вероятно, связаны с особенностями иммуногенеза у этих биологических моделей [2]. Отсутствие протективной эффективности Δ *nlpD*-мутантов в отношении морских свинок может иметь, как минимум, два возможных объяснения.

Во-первых, вероятно, аттенуация в результате мутации по гену *nlpD* приводит к чрезмерному снижению остаточной вирулентности [12, 49], вследствие чего подобные мутанты не способны размножаться в организме морских свинок в течение времени, достаточного для формирования иммунитета.

Во-вторых, нельзя исключить, что липопротейн NlpD возбудителя чумы – это именно тот водо-

нерастворимый «остаточный» антиген R (residue) или один из его составных компонентов, который обладает высокой протективной активностью в отношении морских свинок, индуцируя длительную защиту от чумы [50–52]. Следовательно, его отсутствие в препарате, использованном для иммунизации, может быть основной причиной слабой протективности мутантов Δ *nlpD*.

В настоящее время проводятся эксперименты по проверке этих двух гипотез.

ВЫВОДЫ

Завершая обсуждение полученных данных, следует констатировать, что Δ *nlpD*-мутанты без дополнительной модификации, повышающей их иммуногенность для морских свинок, не перспективны в качестве кандидатов в живые чумные вакцины из-за избирательности иммуногенности в отношении разных видов животных. ●

Работа выполнена в лаборатории микробиологии чумы Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии по государственным контрактам № 40-Д от 30.05.2012 г. и № 34-Д от 08.08.2013 г. в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов: Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 1992. 172 с.
2. Dentovskaya S.V., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2013. V. 28. P. 87–98.
3. Feodorova V.A., Corbel M.J. // *Expert Rev. Vaccines.* 2009. V. 8. P. 1721–1738.
4. Firstova V.V., Tyurin E.A., Kravchenko T.B., Zyrina E.V., Biketov S.F., Dyatlov I.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 954. P. 173–177.
5. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. V. 19. № 2. P. 228–234.
6. Smiley S.T. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 603. P. 376–386.
7. Smiley S.T. // *Immunol. Rev.* 2008. V. 225. P. 256–271.
8. Sun W., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. // *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011. V. 5. № 9. P. 614–627.
9. Анисимов А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*. Саратов: Российский противочумный институт «Микроб»; Оболенск: Государственный научный центр прикладной микробиологии, 1999.
10. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 208 с.
11. Girard G. // *Biol. Med. (Paris)* 1963. V. 52. P. 631–731.
12. Meyer K.F., Smith G., Foster L., Marshall J.D., Jr., Cavanaugh D.C. // *J. Infect. Dis.* 1974. V. 129 (Suppl.). P. 85–120.
13. Perry R.D., Fetherston J.D. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1997. V. 10. P. 35–66.
14. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberman A., Gur D., Aftallon M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., Mamroud E. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e7023.
15. Braciale V.L., Nash M., Sinha N., Zudina I.V., Motin V.L. // Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIH. V. 1. *Frontiers Res. / Ed. Vassil St. Georgiev. Totowa, N.J.: Humana Press Inc.,* 2007. P. 473–480.
16. Derbise A., Cerdà Marín A., Ave P., Blisnick T., Huerre M., Carniel E., Demeure C.E. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012. V. 6. № 2. e1528.
17. Rosenzweig J.A., Chopra A.K. // *Expert Rev. Vaccines.* 2012. V. 11. № 6. P. 659–661.
18. Sha J., Agar S.L., Baze W.B., Olano J.P., Fadl A.A., Erova T.E., Wang S., Foltz S.M., Suarez G., Motin V.L., et al. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 4. P. 1390–1409.
19. Zhang X., Qi Z., Du Z., Bi Y., Zhang Q., Tan Y., Yang H., Xin Y., Yang R., Wang X. // *Vaccine.* 2013. V. 31. № 22. P. 2539–2542.
20. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A., Ber R., Aftalion M., Gur D., Lazar S., Zvi A., Bino T., Ariel N., et al. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 908–915.
21. Garbom S., Forsberg A., Wolf-Watz H., Kihlberg B.M. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 1333–1340.
22. Rappuoli R. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2000. V. 3. P. 445–450.
23. Sun W., Roland K.L., Branger C.G., Kuang X., Curtiss R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6720.

24. Oyston P.C., Mellado-Sanchez G., Pasetti M.F., Nataro J.P., Titball R.W., Atkins H.S. // *Microb. Pathog.* 2010. V. 48. № 5. P. 191–195.
25. Padmalayam I., Kelly T., Baumstark B., Massung R. // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 9. P. 4972–4979.
26. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. // *Infect. Immun.* 2013. V. 81. № 3. P. 815–828.
27. Woodcock D., Crowther P., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S., Michael M., Graham M. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 3469–3478.
28. Simon R., Priefer U., Pulher A. // *Biotechnology.* 1983. V. 1. P. 784–791.
29. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2013. V. 28. P. 41–45.
30. Donnenberg M.S., Kaper J.B. // *Infect. Immun.* 1991. V. 59. P. 4310–4317.
31. Datsenko K., Wanner B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 6641–6645.
32. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kookleva L.M., Protsenko O.A. // *FEMS Microbiol Lett.* 1990. V. 55. P. 5–48.
33. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. // *PLoS One.* 2011. V. 6. e25486.
34. Bahmanyar M., Cavanaugh D.C. *Plague manual.* Geneva: WHO, 1976. 78 p.
35. Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113-02 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 02.03.2002). 69 с.
36. Qiu Y., Liu Y., Qi Z., Wong W., Kou Z., Zhang Q., Liu G., Yang X., Xin Y., Li C., et al. // *Scand. J. Immunol.* 2010. V. 72. P. 425–433.
37. Finney D.J. *Statistical method in biological assay.* 3rd ed. London, England: Charles Griffin, 1978.
38. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. V. 17. P. 434–464.
39. Song Y., Tong Z., Wang J., Wang L., Guo Z., Han Y., Zhang J., Pei D., Zhou D., Qin H., et al. // *DNA Res.* 2004. V. 11. P. 179–197.
40. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., et al. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 5147–5152.
41. Копылов П.Х., Бахтеева И.В., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Левчук В.П., Панферцев Е.А., Платонов М.Е., Светоч Т.Э. и др. Патент на изобретение RU 2439155 C1, РФ, МПК C12N15/10, C07H21/00, C12N15/70, C12N1/21, C12P21/00, C12R1/19, 2010.
42. Bashaw J., Norris S., Weeks S., Trevino S., Adamovicz J.J., Welkos S. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 605–616.
43. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.П., Лебединский В.А., Евстигнеев В.И. // *Журн. микробиол.* 1984. № 4. С. 74–76.
44. Burrows T.W. // *Nature.* 1957. V. 179. P. 1246–1247.
45. Hallett A.F., Issacson M., Meyer K.F. // *Infect. Immun.* 1973. V. 8. P. 876–881.
46. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. // *Vaccine.* 2003. V. 21. P. 3912–3918.
47. von Metz E., Eisler D.M., Hottle G.A. // *Appl. Microbiol.* 1971. V. 22. P. 84–88.
48. Welkos S., Pitt M.L.M., Martinez M., Friedlander A., Vogel P., Tammariello R. // *Vaccine.* 2002. V. 20. P. 2206–2214.
49. Miranda K.L., Poester F.P., Minharro S., Dorneles E.M., Stynen A.P., Lage A.P. // *Vaccine.* 2013. V. 31. P. 3014–3018.
50. Brubaker R.R. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1972. V. 57. P. 111–158.
51. Meyer K.F. // *J. Immunol.* 1950. V. 64. P. 139–163.
52. Schütze H. // *Br. J. Exp. Pathol.* 1939. V. 19. P. 293–298.

УДК 615.277.3; 577.323.23

Комплексообразование с альбумином как фактор фотодинамической активности новых производных бактериопурпуринимида

А. В. Акимова^{1*}, Г. Н. Рычков^{2,3}, М. А. Грин⁴, Н. А. Филиппова⁵, Г. В. Головина¹, Н. А. Дурандин¹, А. М. Виноградов¹, Т. А. Кокрашвили⁶, А. Ф. Миронов⁴, А. А. Штиль⁵, В. А. Кузьмин¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

²Петербургский институт ядерной физики, 188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251,

Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

⁴Московский государственный университет тонких химических технологий

им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

⁵Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва,

Каширское ш., 24

⁶Грузинский технический университет, 0175, Грузия, Тбилиси, ул. Костава, 77

*E-mail: alexa_karpenko@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2014

РЕФЕРАТ Оптимизация химической структуры противоопухолевых фотосенсибилизаторов (ФС) направлена на повышение аффинности к белку-транспортеру – альбумину, и на индукцию необратимых повреждений при освещении опухолевых клеток. Производные бактериопурпуринимида – перспективные ФС, поглощающие свет в ближней инфракрасной области спектра. Спектрофотометрически показано, что новые производные бактериопурпуринимида, отличающиеся заместителями при атомах азота в имидном экзоцикле и пиррольном кольце А, образуют нековалентные комплексы с сывороточным альбумином человека (ЧСА). Величина константы комплексообразования метилового эфира этилокси-ма N-этоксикарбиопурпуринимида (соединение 1) существенно выше, чем у метилового эфира окси-ма N-метоксикарбиопурпуринимида (соединение 2) (1.18×10^5 и $1.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно) (метод Бенеш-Хильдебрандта). Молекулярное моделирование комплексообразования с ЧСА выявило структурные особенности и энергии межмолекулярных взаимодействий 1 и 2 с аминокислотными остатками в сайте связывания гемоподобных молекул белка. Установлено, что этоксилильные группы стабилизируют расположение соединения 1 в этом сайте за счет гидрофобных взаимодействий с белком. Более высокая аффинность соединения 1 к ЧСА позволила использовать его в меньшей концентрации, чем соединения 2, для фотоповреждения культивируемых клеток рака толстой кишки. Фотоактивация 1 и 2 приводила к быстрому (в течение первых минут) некрозу опухолевых клеток. Этот механизм гибели может иметь практическое значение для элиминации опухолевых клеток, устойчивых к другим противоопухолевым воздействиям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА альбумин, константа комплексообразования, некроз, рак, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМСО – диметилсульфоксид; ФБ – фосфатный буфер; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; ЧСА – сывороточный альбумин человека.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое действие экзогенных фотоактивируемых химических соединений в клетках про- и эукариот определяется формированием реакционноспособных частиц и индукцией многочисленных процессов, важнейший из которых – гибель клеток [1, 2]. Этот механизм используется в фотоди-

намической терапии (ФДТ) новообразований, неопухолевых и инфекционных заболеваний [3–5]. В качестве фотосенсибилизаторов (ФС) для ФДТ наиболее часто используются соединения, содержащие тетрапиррольные макроциклы: порфирины и их гидрированные аналоги – хлорины и бактериохлорины [3].

Оптимизация структуры ФС, направленная на повышение их клинической эффективности, включает следующие направления. Во-первых, необходимо добиться фотоповреждения глубоких слоев ткани в очаге поражения. С этой целью используют, в частности, производные бактериохлорофилла *a*, поглощающие свет в длинноволновой области спектра (ближний инфракрасный диапазон) [6–9]. Во-вторых, ФС должен взаимодействовать с транспортными белками, главным образом с альбумином (сывороточный альбумин человека, ЧСА), для эффективной доставки в патологический очаг. Повышение аффинности такого взаимодействия может быть достигнуто введением в макроцикл катионов металлов и модификацией периферических заместителей [10–15]. Помимо транспортной функции, комплексы ЧСА с Pd-содержащим бактериохлорином выполняют функцию фотокаталитической оксидоредуктазы, существенно повышая выход активных форм кислорода и фотодинамический эффект [2].

Наконец, важна способность ФС вызывать обратимое фотоповреждение (гибель) клеток, устойчивых к другим терапевтическим воздействиям. Эта способность приобретает особое значение в ситуациях, когда нельзя использовать другие лечебные методы (невозможность радикального хирургического лечения, резидуальные опухоли после комбинированной терапии и др.). Фотоиндуцированная гибель клеток может протекать по механизму некроза; существенное отличие этого механизма – первичное необратимое повреждение плазматической мембраны и мембранных органелл [5].

Цель настоящей работы – исследование количественных параметров комплексообразования ЧСА с двумя производными бактериопурпуринимида, которые отличаются друг от друга периферическими заместителями. Эти параметры рассматриваются как фактор эффективности индукции фотонекроза опухолевых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследованы производные бактериопурпуринимида с различными заместителями при атоме азота в имидном экзоцикле (этокси **1**- и метокси **2**-группы) и пиррольном кольце А (N-этокси **1**- и N-гидрокси **2**-группы) (рис. 1). Соединения получали обработкой бактериопурпурина этоксиамином (**1**) [16] и гидросиламином (**2**) с последующим метилированием diaзотетаном [17], растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО; «Марбиофарм», РФ) до концентрации 10 мМ и хранили при 4 °С. Концентрации **1** и **2** определяли по величине известных коэффициентов экстинкции в хлороформе [16, 17].

Для изучения комплексообразования ЧСА (Sigma Aldrich, США) растворяли в 20 мМ фосфатном буфере (ФБ), pH 7.0. Концентрации растворов **1** и **2** – 1×10^{-5} М, ЧСА – $0 - 5 \times 10^{-4}$ М. Соединения **1** и **2** добавляли в ФБ из исходного раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО). Конечная концентрация ДМСО в экспериментальных растворах – 1%.

Спектры поглощения исследуемых растворов измеряли с использованием спектрофотометра Shimadzu UVVIS3101PC (Япония) в кварцевых кюветках (0.4 × 1.0 см), оптический путь составлял 1 см (спектральная ширина щели 1 нм). Спектры поглощения красителей в присутствии ЧСА регистрировали в диапазоне 380–950 нм.

Константу связывания **1** и **2** с ЧСА определяли по изменению оптической плотности в максимуме Q-полосы пигмента в комплексе с ЧСА при добавлении белка к раствору **1** или **2**. Искомые величины вычисляли из уравнения Бенеша–Хильдебрандта [18]:

$$\frac{1}{dD} = \frac{1}{\Delta\epsilon[l]} + \frac{1}{K_c(\Delta\epsilon[l])} \cdot \frac{1}{[HSA]}, \quad (1)$$

где dD – изменение оптической плотности раствора без и при добавлении ЧСА, измеренное в максимуме поглощения комплекса с белком; $\Delta\epsilon$ – изменение значения молярного коэффициента экстинкции в отсутствие и присутствии ЧСА, K_c – константа связывания, $[l]$ – концентрация лигандов **1** или **2**, $[HSA]$ – концентрация ЧСА.

Фотосенсибилизирующую активность **1** и **2** изучали на клетках линии НСТ116 (рак толстой кишки человека). Клетки культивировали в модифицированной Дульбекко среде. Игла с добавлением 5% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ЕД/мл пенициллина

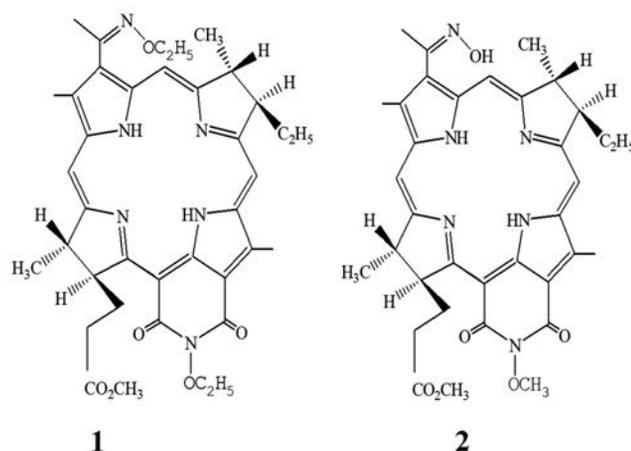


Рис. 1. Производные бактериопурпуринимида **1** и **2**

(«ПанЭко», Россия) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки высевали в 35-мм чашки Петри (2 × 10⁴ клеток в 3 мл культуральной среды). Через 16 ч вносили соединения **1** или **2** (конечные концентрации указаны в разделе «Результаты») и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Культуральную среду удаляли, монослой клеток промывали ФБ и освещали красным светом через водный фильтр (насыщенный водный раствор NaNO₂) толщиной 1 см. В качестве источника излучения использовали лампу накаливания. Длительность освещения – до 20 мин. Контролем служили культуры, освещенные в отсутствие **1** или **2**, а также клетки, нагруженные этими соединениями, но не подвергнутые освещению (темновое воздействие). Целостность клеток оценивали в тесте исключения трипанового синего.

Для проведения электронной микроскопии клетки линии НСТ116 высевали в 60-мм чашки Петри (10⁵ клеток в 5 мл культуральной среды). Добавление **1** или **2** и освещение клеток проводили по вышеописанному методу. После окончания воздействий клетки открепляли от подложки с помощью версена и трипсина и фиксировали 1% раствором глутарового альдегида в ФБ. Препараты анализировали на электронном микроскопе Shimadzu (Япония).

Грубые пространственные модели молекул **1** и **2** были построены с использованием программ Molsoft ICM версии 3.7 [19] и Avogadro [20], на основе структуры пурпурина *a*, взятой из базы данных ChemSpider (www.chemspider.com) (номер записи 16736724 на 15.08.2013). Оптимизация их структуры проведена в программе Gamess US [21]. Мультиплетность электронного состояния молекул выбрана равной 1, зарядовое состояние – нейтральным. Структуру оптимизировали по стандартному протоколу методом квадратичной аппроксимации в MINI базисе Хузинаги [22]. Волновые функции самосогласованного поля рассчитывали ограниченным методом Хартри–Фока (RHF – Restricted Hartree Fock) [23].

Моделью ЧСА послужила пространственная структура 1N5U [24] из банка данных Protein Data Bank. Перед проведением процедуры «гибкого» докинга молекулы миристиновой кислоты, протопорфирина IX и воды удаляли из структуры ЧСА, а каждому атому **1** и **2** присваивали заряд, рассчитанный *ab initio* по результатам оптимизации геометрии. Процедуру «гибкого» докинга проводили в пакете Molsoft ICM Pro 3.7 по протоколу, подробно описанному авторами программы [19, 25, 26]. Докинг запускали трижды из различных начальных положений и конформаций **1** и **2** и ЧСА. Полученный ансамбль конформаций использовали для вычисления средней свободной энергии связывания (E_C) по формуле Гиббса–Больцмана:

$$E_C = \sum_n E_n \frac{e^{-\frac{E_n}{kT}}}{Z}, \quad (2)$$

где Z – статистическая сумма по свободным энергиям связывания E_n лигандов из ансамбля при температуре $T = 300$ К. При расчете свободной энергии связывания учитывали только вклад электростатической и гидрофобной составляющих, а также энтропийный вклад боковых цепей аминокислот белка. Электростатическую составляющую рассчитывали методом REBEL [27]. Константа диэлектрической проницаемости ЧСА, **1**, **2** и комплексов в соответствии с рекомендациями разработчиков программы была установлена равной 12.7; константа диэлектрической проницаемости водной среды, представленной непрерывной моделью, – 78.5. Гидрофобную составляющую каждого атома ЧСА оценивали на основе предположения о ее линейной пропорциональности поверхности атома, доступной растворителю. Коэффициент поверхностного натяжения выбран равным 0.012 ккал/(моль × Å²). Потеря конфигурационной энтропии боковых цепей аминокислот белка при связывании с **1** или **2** проводилась на основе табулированных данных о ее максимально возможных величинах для каждого аминокислотного остатка [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектрофотометрия

На рис. 2 показаны спектры поглощения производных бактериопурпуринимида **1** и **2** в отсутствие и в присутствии ЧСА. В ФБ полосы поглощения **1** соответствуют 539 и 899 нм. Отсутствие полосы при 899 нм в этиловом спирте и хлороформе (данные не приведены) указывает на то, что эта полоса соответствует J-агрегату [28]. Соединение **2** в ФБ характеризуется полосами поглощения при 421, 550 и 800 нм. Отсутствие дополнительных полос относительно этилового спирта и хлороформа указывает на то, что соединение **2** не образует J-агрегатов в ФБ.

При добавлении ЧСА наблюдали трансформацию основных полос поглощения обоих соединений. Для **1** это выражалось в уменьшении интенсивности полосы 899 нм, увеличении интенсивности полосы 539 нм и появлении полос 419 и 802 нм; последняя, вероятно, соответствует мономеру **1** (рис. 2А). Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов молекул **1** с ЧСА. Спектральные кривые проходят через изобестическую точку, что указывает на равновесие в системе мономер–агрегат. Таким образом, при увеличении концентрации белка происходит смещение равновесия мономер–агрегат в сторону мономера. Полученный результат согласуется с данными о раз-

рушении агрегатов при комплексообразовании производных порфиринов с альбумином [29].

На *рис. 2Б* приведены спектры поглощения **2** в присутствии ЧСА. При увеличении концентрации белка увеличивается значение оптической плотности пиков, соответствующих 422, 545 и 808 нм. Наблюдается гипсохромный сдвиг длинноволнового максимума на 10 нм. Полоса с максимумом в 545 нм претерпевает батохромный сдвиг на 3.5 нм к 548.5 нм. Изменения спектров поглощения при добавлении ЧСА указывают на комплексообразование с **2**, а наличие изобестической точки в районе 835 нм – на одно равновесие мономер–комплекс с альбумином и образование стабильного комплекса мономера **2** и ЧСА.

Графики Бенеси–Хильдебрандта для **1** и **2** и ЧСА представлены на *рис. 2В*. Величина константы комплексообразования соединения **1** и ЧСА составила $1.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, тогда как у **2** этот показатель значительно меньше – $1.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, т.е. сродство к ЧСА соединения **1** на порядок выше, чем комплексов **2** с ЧСА.

Молекулярное моделирование

В ЧСА сайт связывания гемоподобных молекул (FA1) представляет собой узкую и достаточно глубокую «впадину» на поверхности субдомена IV, сформированную в основном гидрофобными остатками аминокислот [30]. Позиции соединений **1** и **2**, найденные по результатам «гибкого» докинга, находятся внутри сайта FA1 в положениях, сходных с положением протопорфирина IX в кристаллической структуре с кодом 1N5U (Protein Data Bank) (*рис. 3А*). Именно у таких позиций наиболее низкая свободная энергия связывания E_c , поэтому эти позиции наиболее вероятны. Макроцикл обоих соединений эффективно «прячет» поверхность своих гидрофобных групп внутри впадины. Гидроксильная группа Tyr161 располагается вблизи центра макроцикла, однако, в сравнении с протопорфирином IX макроцикл сдвинут в сторону входа в сайт связывания примерно на 1 Å. Результаты молекулярного моделирования показывают, что у **2** многообразие конформаций в сайте связывания FA1 ЧСА шире, чем у **1**. Однако конформации обоих соединений с наибольшей величиной оценочной функции практически совпадали в пространстве (*рис. 3Б*).

Важно отметить, что в указанной конформации гидроксильная группа пиррольного кольца А соединения **2** оказывается в гидрофобном окружении, образованном остатками Leu135, Leu139, Ala168 и алифатической частью Tyr161, внутри сайта связывания (*рис. 4Б*), теряя энергетически выгодную водородную связь. Поэтому маловероятно, что такая конформа-

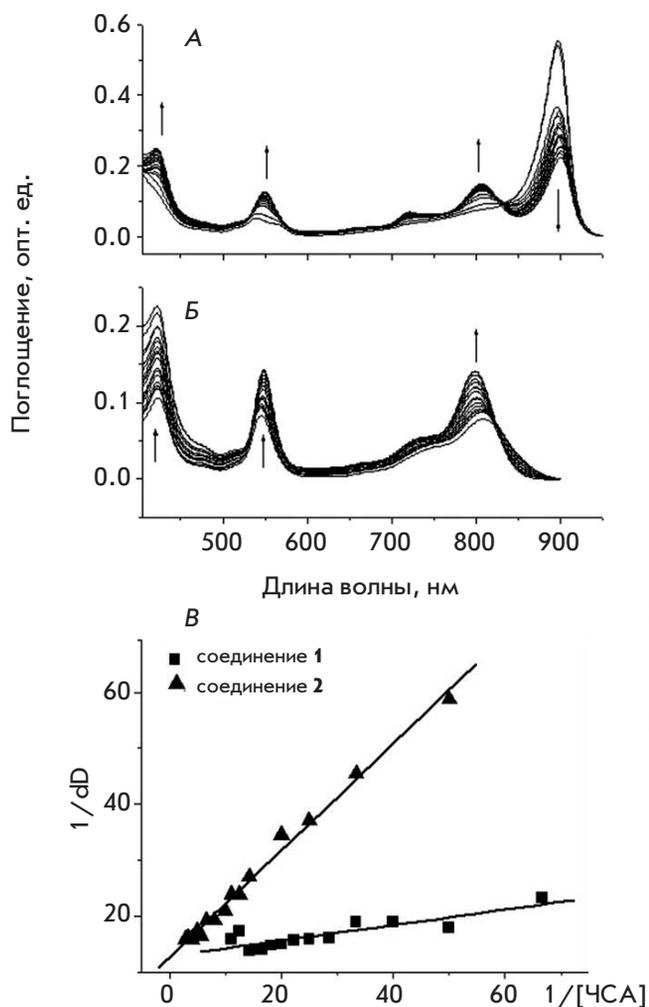


Рис. 2. Спектры поглощения соединений **1** (А) и **2** (Б) (20 мМ ФБ, рН 7.0) в присутствии и в отсутствие ЧСА и графики зависимости Бенеси–Хильдебрандта для **1** и **2** в комплексах с ЧСА (В). Стрелками показаны направления изменения спектров **1** и **2** при увеличении концентрации ЧСА

ция будет реализовываться при взаимодействии **2** с ЧСА. В свою очередь, этокси-группа пиррольного кольца **1** образует в этом месте плотный гидрофобный контакт с ЧСА (*рис. 4А*), что энергетически выгодно. Средняя свободная энергия связывания с ЧСА составила -10.5 ккал/моль для соединения **1** и -9.3 ккал/моль для соединения **2** (без учета указанных конформаций). Эти величины хорошо коррелируют с константами связывания **1** и **2** с ЧСА, полученными экспериментально (*рис. 2*).

Фотодинамическая активность в культуре клеток

В отсутствие освещения соединения **1** и **2** в концентрациях до 50 мкМ не вызывали гибель клеток ли-

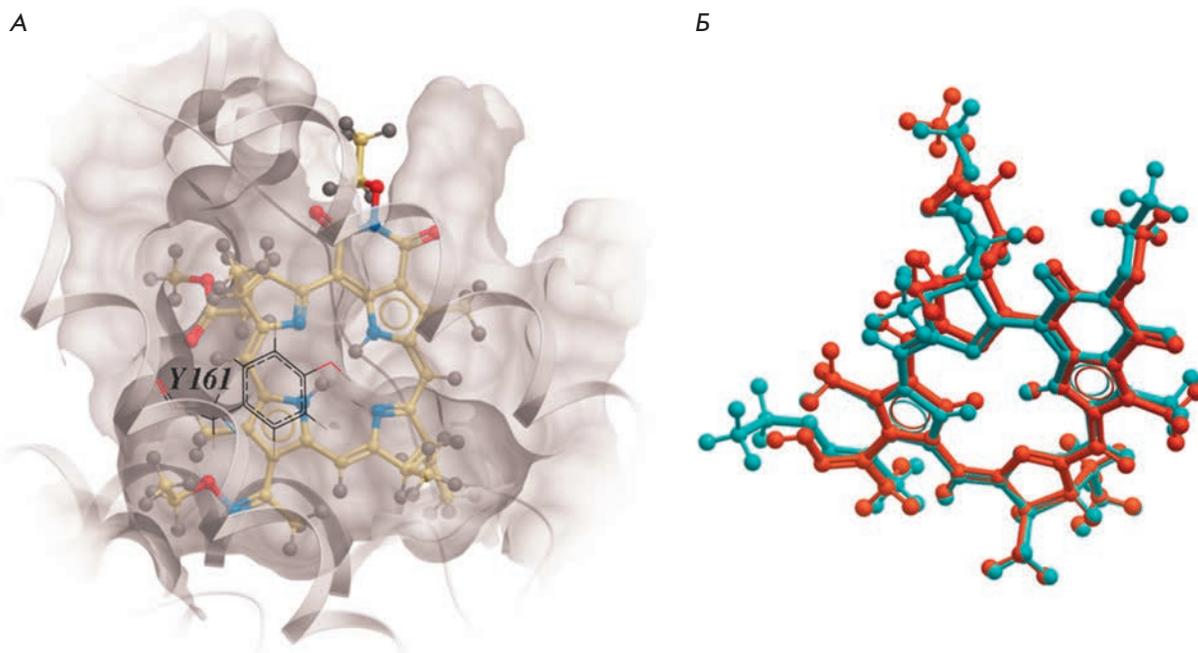


Рис. 3. А – наиболее вероятная позиция соединения **1** в сайте FA1 ЧСА, найденная методом молекулярного «гибкого» докинга. На переднем плане указано положение остатка Tyr161. Б – наиболее вероятные конформации **1** и **2** в сайте FA1. Сине-зеленый цвет – соединение **1**, оранжевый – **2**. Макроциклы обоих соединений практически совпадают в пространстве

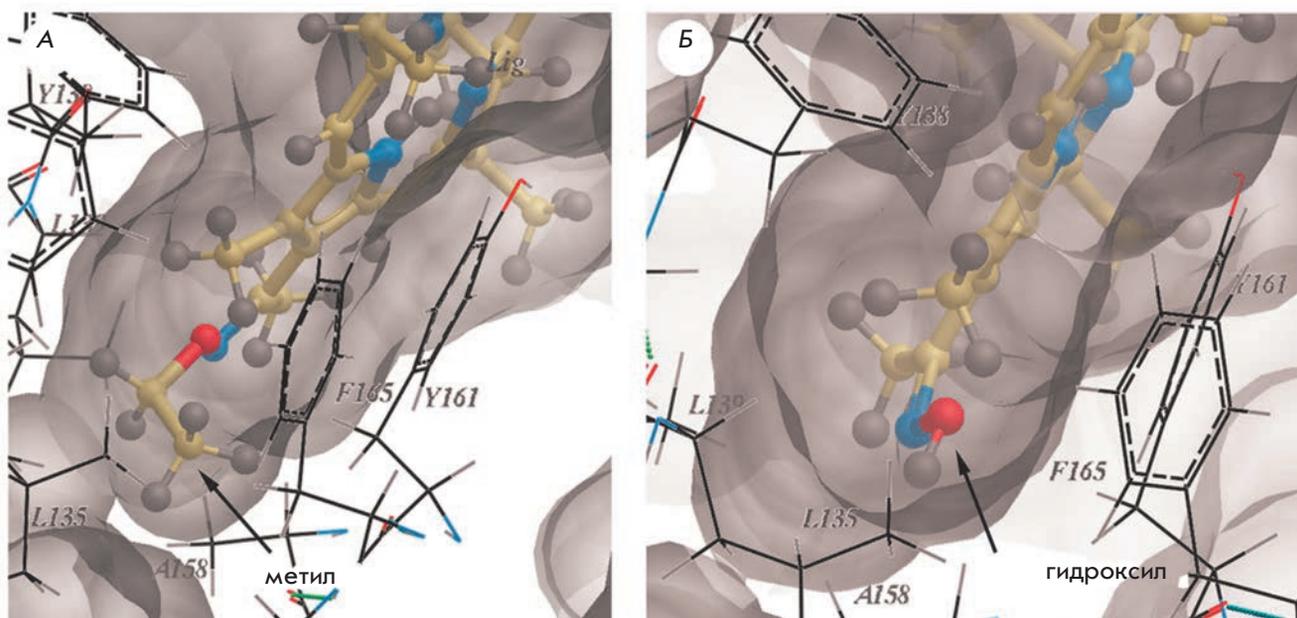


Рис. 4. Позы соединений **1** и **2** в сайте связывания FA1 ЧСА, обладающие наибольшей величиной оценочной функции. Сайт связывания FA1 отображен молекулярной поверхностью серого цвета. Цвета атомов: бежевый – углерод, серый – водород, синий – азот, красный – кислород. У соединения **1** в гидрофобном окружении оказывается неполярная метильная группа (А), у **2** – полярная гидроксильная группа (Б)

нии НСТ116 в условиях непрерывного воздействия в течение 72 ч. Напротив, фотосенсибилизирующая способность **1** и **2** оказалась высокой: для индукции повреждения клеток достаточны микромолярные концентрации **1** или **2**. После 15 мин освещения клеток, обработанных каждым из исследованных соединений, доля поврежденных клеток составила 100% для **1** и 57.8% для **2** (рис. 5А). После инкубации с 1 мкМ каждого ФС доля погибших клеток возрастала при увеличении продолжительности освещения до 20 мин (для **1**), тогда как в случае соединения **2** процент погибших клеток не увеличивался после освещения в течение 10–15 мин (рис. 5В). Практически полная гибель культуры наблюдалась после 10-минутного воздействия света после инкубации клеток с 5 мкМ соединения **1** (рис. 5В).

Электронная микроскопия

С целью детального исследования механизма гибели клеток мы проанализировали ультраструктуру гибнущих клеток методом трансмиссивной электронной микроскопии. На рис. 6А–В представлены результаты электронной микроскопии клеток НСТ116, освещенных в отсутствие ФС (контроль) или после инкубации с **1**. В контрольных клетках (рис. 6А) плазматические мембраны на свободных поверхностях образуют микроворсинки, характерные для эпителия кишечника. В цитоплазме определяются митохондрии, цистерны эндоплазматического ретикулума, рибосомы, пузырьки пластинчатого комплекса. Хроматин распределен диффузно по ядру, образуя более плотные скопления преимущественно по периферии. Ядра имеют округлую форму с неглубокими инвагинациями ядерных мембран.

После 10-минутного освещения клеток, нагруженных соединением **1**, отмечено набухание митохондрий и уменьшение плотности их матрикса (рис. 6Б). Встречаются митохондрии с поврежденными кристами и «вымывтым» матриксом, липидные капли, небольшое расширение цистерн эндоплазматического ретикулума. Большинство клеток приобретают неправильную форму за счет выростов, образуемых плазматическими мембранами. Целостность плазматических мембран сохранена. В ядрах снижается количество хроматина, в ядрышках увеличиваются участки плотного фибриллярного компонента. После 20-минутного освещения в цитоплазме увеличивается число лизосом и липидных включений, а в ядрах уменьшается количество хроматина. Значительное число клеток разрушено (рис. 6В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что модификация периферических заместителей в молекуле бактериопурпуринида

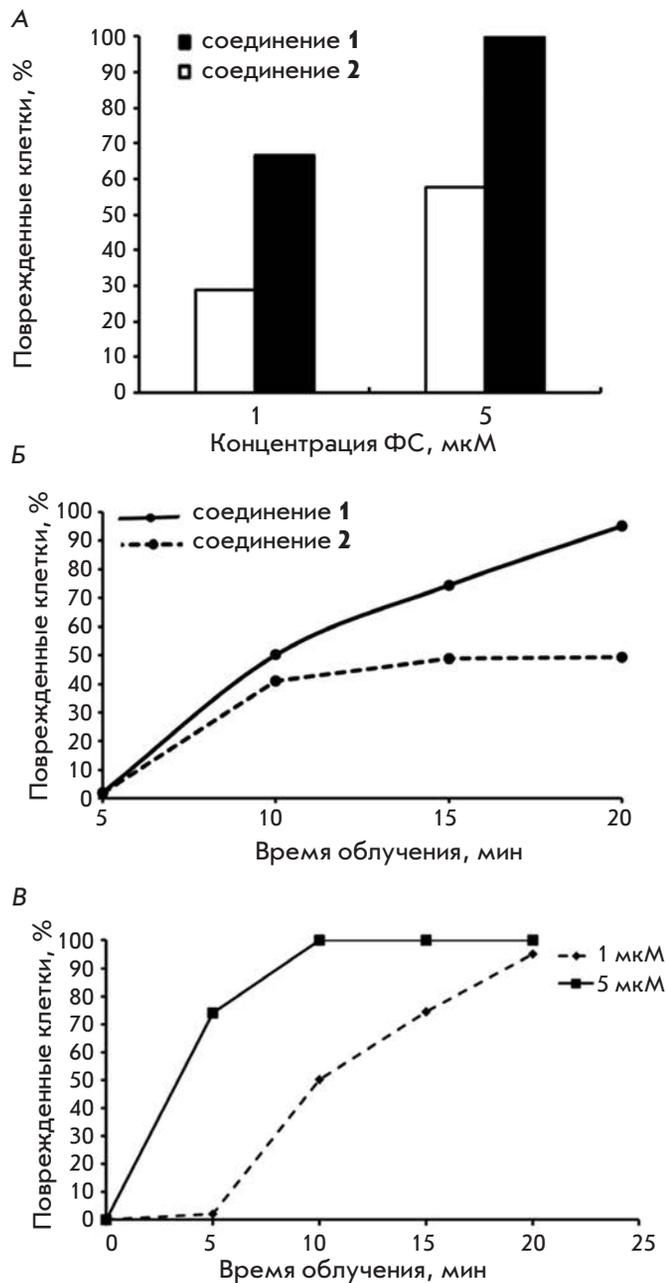


Рис. 5. Зависимость фотоповреждения клеток рака кишки (линия НСТ116) от концентрации ФС и времени освещения. А – освещение 15 мин; Б – 1 мкМ **1** или **2**; В – соединение **1**

существенно изменяет фотодинамическую эффективность ФС. Производное бактериопурпуринида с этокси-группами при атомах азота в экзоцикле и пиррольном кольце А (соединение **1**) образует более прочные комплексы с белком-переносчиком ЧСА. Данные результаты получены экспериментальным путем и подтверждены молекулярным мо-

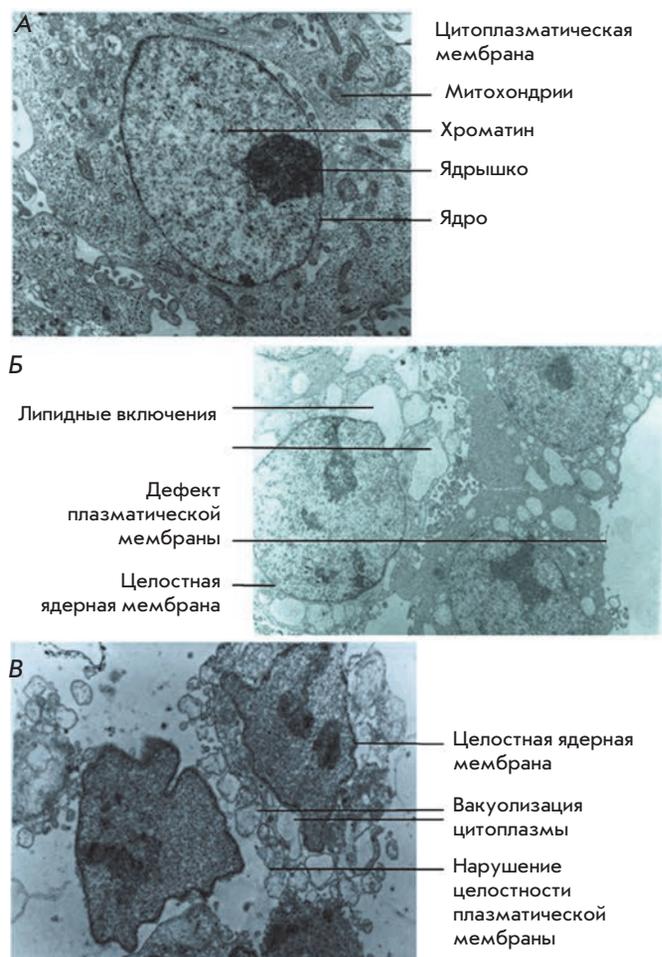


Рис. 6. Ультраструктурные признаки фотоповреждения клеток линии NCT116. А – интактные клетки; освещение в течение 10 (Б) и 20 (В) мин. Увеличение $\times 5000$

делированием комплексов ФС–ЧСА. Уменьшение аффинности соединения 2 к ЧСА обусловлено тем, что при связывании внутри сайта FA1 гидроксильная группа оксима оказывается в гидрофобном окружении. Теряется энергетически выгодная водородная связь с водой, что ослабляет связывание с белком. Напротив, этокси-группа соединения 1 способствует более прочному связыванию с белком за счет гидрофобных взаимодействий.

Соединения 1 и 2 оказались высокоактивными ФС: для индукции гибели клеток достаточны микромолярные концентрации и кратковременная инкубация. Важно, что более высокая константа комплексообразования с ЧСА соединения 1 соответствовала большей фотоактивности этого ФС в культуре клеток. Предстоит оценить влияние периферического заместителя на такие параметры

фотоактивности, как накопление и распределение ФС в клетках, способность генерировать реакционноспособные частицы (выход синглетного кислорода или кислородных радикалов).

Мы полагаем, что повышенная аффинность 1 к ЧСА обуславливает высокий выход активных форм кислорода при фотоактивации. Эти метаболиты – ключевые в процессах фотоповреждения биомакромолекул. Нековалентный комплекс 1–ЧСА может выступать в роли активируемой светом оксидоредуктазы и многократно катализировать перенос электрона от молекулы ФС в триплетном состоянии к молекулярному O_2 , усиливая образование активных форм кислорода. Механизм, при котором ФС в возбужденном триплетном состоянии может непосредственно взаимодействовать с субстратом и/или растворителем через перенос протона или электрона, описан ранее [2].

Высокая фотоактивность 1 и 2 для опухолевых клеток обусловлена их способностью вызывать некроз – первичное повреждение плазматической мембраны. Фотонекроз регистрировался в первые минуты воздействия света и сопровождался выраженными и необратимыми нарушениями структуры клеток. Эти нарушения выявлены в цитоплазме, тогда как ядро сохраняло свою структуру. Схожая картина фотонекроза выявлена при активации мембранотропного борированного производного хлорина e_6 [5]. Эти особенности отличают 1 и 2 от других ФС, которые вызывают фотогибель клеток путем других механизмов – апоптоза и аутофагии [31–34]. Мы полагаем, что быстрая гибель опухолевых клеток как исход ФДТ желательна в клинических ситуациях, особенно для элиминации опухолей с первичной или приобретенной лекарственной устойчивостью. Вместе с тем требуется оценить значение возможных иммунологических реакций в ответ на некроз индуцирующую ФДТ.

В представленной работе обоснована необходимость оптимизации длинноволновых (инфракрасных) ФС для ФДТ. Критериями оптимизации служат повышение аффинности к белку-переносчику ЧСА и способность вызывать фотонекроз. Действительно, химическая модификация бактериопурпуринида позволяет получить соединения с повышенным сродством к ЧСА и способностью вызывать необратимые фотоповреждения опухолевых клеток. Эти особенности, а также отсутствие темновой цитотоксичности и достаточная растворимость в водных средах (по крайней мере в диапазоне концентраций, необходимых для индукции фотонекроза) позволяют считать новые производные бактериопурпуринов перспективными для дальнейшей разработки. ●

Г.Н. Рычков благодарит за поддержку Комитет по науке и высшей школе администрации г. Санкт-Петербурга.
Работа поддержана РФФИ (грант №11-03-00620) и Федеральной целевой

программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы» (госконтракт № 14.512.11.0016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Phillips D. // *Int. Rev. J.* 1997. V. 22. № 3/4. P. 3–50.
- Ashur I., Goldschmidt R., Pinkas I., Salomon I., Szewczyk G., Sarna T., Scherz A. // *J. Phys. Chem. A.* 2009. V. 113. P. 8027–8037.
- Josefsen L.B., Boyle R.W. // *Theranostics.* 2012. V. 3. № 9. P. 916–966.
- Chen Y., Li G., Pandey R.K. // *Curr. Org. Chem.* 2004. № 8. P. 1105–1134.
- Moisenovich M.M., Ol'shevskaya V.A., Rokitskaya T.I., Ramonova A.A., Nikitina R.G., Savchenko A.N., Tatarskiy V.V., Kaplan M.A., Kalinin V.N., Kotova E.A., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9. P. e12717.
- Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2008. V. 8. № 6. P. 683–697.
- Oertel M.I., Schastak S.L., Tannapfel A., Hermann R., Tannapfel A., Hermann R., Sack U., Mossner J., Berr F. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2003. V. 71. P. 1–10.
- Dąbrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbańska K., Simões S., Stochel G., Cortes L. // *Free Rad. Biol. Med.* 2012. V. 52. P. 1188–1200.
- Меерович И.Г., Грин М.А., Ципровский А.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Лощенов В.Б., Барышников А.Ю., Миронов А.Ф. // *Рос. биотер. журн.* 2007. Т. 6. № 1. С. 22.
- Ol'shevskaya V.A., Nikitina R.G., Guiul'malieva M.A., Zaitsev A.V., Luzgina V.N., Kononova E.G., Ivanov O.G., Burmistrova N.V., Kaplan M.F., Kalinin V.N., et al. // *Org. Biomol. Chem.* 2006. V. 4. P. 3815–3821.
- Ol'shevskaya V.A., Nikitina R.G., Savchenko A.N., Malshakova M.V., Vinogradov A.M., Golovina G.V., Belykh D.V., Kutchin A.V., Kaplan M.A., Kalinin V.N., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. V. 17. № 3. P. 1297–1306.
- Ol'shevskaya V.A., Savchenko A.N., Zaitsev A.V., Kononova E.G., Petrovskii P.V., Ramonova A.A., Tatarskiy V.V. Jr., Moisenovich M.M., Kalinin V.N., Shtil A.A. // *J. Organometal. Chem.* 2009. V. 694. № 11. P. 1632–1637.
- Пшенкина Н.Н. // *Мед. акад. журн.* 2011. Т. 11. № 3. С. 3–15.
- Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004. V. 56. P. 53–76.
- Tsuchida T., Zheng G., Pandey R.K., Potter W.R., Bellnier D.A., Henderson B.W., Kato H., Dougherty T.J. // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 66. № 2. P. 224–228.
- Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., Меерович Г.А., Меерович И.Г., Оборотова Н.А., Трещалина Е.М., Лощенов В.Б., Барышников А.Ю., Цыганков А.А. // *Патент России № 2411943.* Бюл. № 29. 2011.
- Mironov A.F., Grin M.A., Tsiprovskiy A.G. // *J. Porph. Phthalocyan.* 2002. V. 6. № 5. P. 358–361.
- Benesi H.A., Hildebrandt J.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1949. V. 71. P. 2703–2707.
- Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. // *J. Comput. Chem.* 1994. V. 15. P. 488–506.
- Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. // *J. Chem. Inform.* 2012. V. 4. № 1. P. 17.
- Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. // *J. Comput. Chem.* 1993. V. 14. № 11. P. 1347–1363.
- Huzinaga S., Andzelm J., Klobukowski M., Radzio-Andzelm E., Sakai Y., Tatewaki H. *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations.* Amsterdam: Elsevier, 1984. 240 p.
- Roothaan C.C.J. // *Rev. Modern Phys.* 1951. V. 23. № 2. P. 69.
- Wardell M., Wang Z., Ho J.X., Robert J., Ruker F., Ruble J., Carter D.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 291. № 4. P. 813–819.
- Fernández-Recio J., Totrov M., Abagyan R. // *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics.* 2003. V. 52. № 1. P. 113–117.
- Totrov M., Abagyan R. // *Proteins.* 1997. Suppl. 1. P. 215–220.
- Totrov M., Abagyan R. // *Peptide Sci.* 2001. V. 60. № 2. P. 124–133.
- Eisfeld A., Briggs J.S. // *Chem. Phys.* 2006. № 324. P. 376–384.
- Yao-Bing Y., Wang Y.-N., Ma J.-B. // *Spectrochim. Acta. Part A.* 2006. V. 64. P. 1032–1038.
- Ascenzi P., Fasano M. // *IUBMB Life.* 2009. V. 61. № 12. P. 1118–1122.
- Garg A.D., Bose M., Ahmed M.I., Bonass W.A., Wood S.R. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e34475.
- Chin W.W., Heng P.W., Bhuvaneshwari R., Lau W.K., Olivo M. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2006. № 5. P. 1031–1037.
- Calin M.A., Paraska S.V. // *J. Optoelectron. Adv. Mat.* 2006. V. 8. № 3. P. 1173–1179.
- Evans C.L., Abu-Yousif Adnan O., Jin P. Yong, Klein O.J., Celli J.P., Rizvi I., Zheng X., Hasan T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e23434.

УДК 577.112; 577.151; 579.66; 616.15

Рекомбинантная α -N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты А-эритроцитов

Л. А. Балабанова^{1,2*}, В. А. Голотин¹, И. Ю. Бакунина¹, Л. В. Слепченко¹, В. В. Исаков¹, А. Б. Подволоцкая², В. А. Рассказов¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостоку, 159

²Дальневосточный федеральный университет, 690950, Владивосток, ул. Суханова, 8

*E-mail: balaban@piboc.dvo.ru

Поступило в редакцию 14.11.2014

РЕФЕРАТ На основе рЕТ-40b сконструирована плаزمид, определяющая синтез рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *Arenibacter latericius* КММ 426^T (α -AlNaGal) в клетках *Escherichia coli*. В условиях экспрессии при температуре 16°C, концентрации индуктора 0.2 мМ и культивирования в течение 12 ч выход α -AlNaGal достигает 10 мг/л с общей активностью 49.7 ± 1.3 U. Разработаны процедуры очистки α -AlNaGal с использованием анионообменной, металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации. α -AlNaGal представляет собой гомодимер с молекулярной массой 164 кДа, стабильна до 50°C с температурным оптимумом реакции при 20–37°C, и ее активность не зависит от присутствия ионов металлов в инкубационной среде. Методом ¹H-ЯМР-спектроскопии показано, что α -AlNaGal катализирует гидролиз O-гликозидной связи с сохранением стереохимической конфигурации аномерного атома и реализует механизм, характерный для семейства 109 гликозидгидролаз. α -AlNaGal снижает серологическую активность А-эритроцитов при pH 7.3, что делает ее в перспективе пригодной для конверсии А- и АВ-эритроцитов в эритроциты группы крови О.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гликозидгидролаза GH109, *Arenibacter latericius*, ¹H-ЯМР-спектроскопия, конверсия А-эритроцитов.

ВВЕДЕНИЕ

α -N-Ацетилгалактозаминидазы [К.Ф. 3.2.1.49] катализируют отщепление 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозильных остатков, связанных α -O-гликозидной связью (GalNAc α), от невосстанавливающих концов олигосахаридов и гликоконъюгатов, в частности агглютиногенов групп крови человека А и АВ. α -N-Ацетилгалактозаминидазы используются для изучения структуры природных соединений и синтеза новых олигосахаридов [1]. Изучение α -N-ацетилгалактозаминидаз обусловлено также их участием в катаболизме сложных олигосахаридов в организме человека [2]. Практический интерес к ферменту возник в связи с возможностью его использования для конверсии крови групп А и АВ в универсальную кровь группы О путем дегликозилирования антигенных детерминант [3]. С этой целью были выделены гликозидгидролазы семейства 27 (GH27) из печени курицы и семейства 36 (GH36)

из бактерии *Clostridium perfringens* [4, 5]. Они имели ряд недостатков для биотехнологического использования, таких, как нефизиологический pH-оптимум и неэффективность в отношении эритроцитов подгруппы А₁.

В результате скрининга 3000 штаммов морских бактерий у *Arenibacter latericius* КММ 426^T обнаружили α -N-ацетилгалактозаминидазу, которая при нейтральных значениях pH эффективно инактивировала серологическую активность А₁- и А₂-антигенов эритроцитов [6, 7]. Согласно классификации по структурной гомологии α -N-ацетилгалактозаминидаза *A. latericius* КММ 426^T была отнесена к гликозидгидролазам семейства 109 (GH109) [8, 9].

В данной работе предложен способ получения рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы (α -AlNaGal) для исследования ее ферментативных свойств.

Нуклеотидная последовательность гена α -AlNaGal была амплифицирована с хромосомной ДНК морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T с помощью праймеров: Nac40_NcoI: 5'-ТТААССАТGGAAAАТСТТТА-ТТТТСАGGGTGGGGCTAAGTACATGGGCGGTTT-ТТСТГСТ-3', и Nac40_SalI: 5'-ТТАAGTСGA-САССТGAAAАТААAGАТТТТСГСТТАСААТ-АТСТААТGGTGCAGTGGT-3' («Евроген»). ПЦР проводили в амплификаторе Eppendorf по схеме: 95°C – 2 мин и 35 циклов 95°C – 15 с, 72°C – 1 мин. Ген α -AlNaGal клонировали в векторе pET-40b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции NcoI и SalI после последовательности DsbC и His-tag. Рекомбинантные плазмиды получали в клетках *Escherichia coli* DH5 α . Штамм-продуцент α -AlNaGal получали путем трансформации плазмиды в клетки *E. coli* Rosetta(DE3). Ночную культуру штамма-продуцента выращивали в колбе (1 л) с жидкой средой LB (pH 7.7), содержащей 25 мг/мл канамицина, на шейкере (200 об/мин, 37°C), до OD₆₀₀ = 0.6–0.8, затем добавляли 0.2 мМ изопропил- β -D-тиогактопиринозид (ИПТГ) и инкубировали при 16°C в течение 12 ч.

Активность α -AlNaGal определяли по расщеплению *n*-нитрофенил- α -N-ацетилгалактозаминида. Реакционная смесь (400 мкл) содержала 10 мМ NaH₂PO₄, pH 7.2, 3 мМ субстрата и фермент. После 20 мин инкубации при 20°C реакцию останавливали добавлением 0.6 мл 1 М Na₂CO₃. Количество образовавшегося продукта реакции определяли при 400 нм. За единицу активности (U) принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкМ *n*-нитрофенола за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Выход общей активности с 1 л культуры составлял 49.7 ± 1.3 U.

Очистку α -AlNaGal проводили при +6°C. Клетки *E. coli* центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин, ресуспендировали в 200 мл буфера А (0.01 М NaH₂PO₄, pH 7.8, 0.01% NaN₃) и озвучивали на УЗДН 2-Т. Раствор центрифугировали (25 мин, 11000 об/мин) и наносили на уравновешенную буфером А колонку (2.5 × 37 см) с ионообменной смолой DEAE-MacroPrep (Bio-Rad). Элюцию проводили линейным градиентом 0–0.25 М NaCl в буфере А. Активные фракции собирали и наносили на колонку (1 × 2 см) с Ni-агарозой (Qiagen). Белок элюировали 50 мМ EDTA. Элюат подвергали гель-фильтрации на колонке (1.5 × 170 см) с сефакрилом S-200HR (Sigma), уравновешенной в буфере А. Гомогенность препарата α -AlNaGal определяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез) (рис. 1). По результатам гель-фильтрации α -AlNaGal является гомодимером

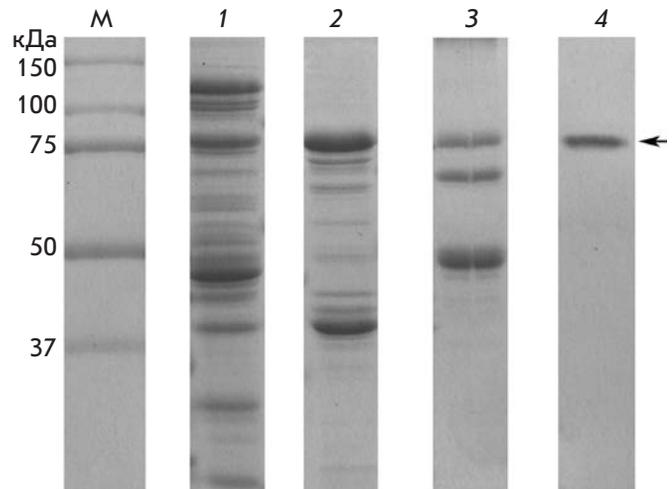


Рис. 1. Экспрессия и очистка α -AlNaGal в ДСН-ПААГ (12%): М – маркер молекулярной массы белков (Bio-Rad); 1 – клеточный экстракт; 2 – DEAE-MacroPrep; 3 – Ni-агароза; 4 – Sephacryl S-200HR. Стрелкой указана область миграции α -AlNaGal

с молекулярной массой 164 или 96 кДа после удаления плазмидной последовательности DsbC по сайту энтерокиназы (Novagen). Фермент стабилен до 50°C с температурным оптимумом при 20–37°C, его активность не зависит от присутствия ионов металлов в инкубационной среде. Дополнительные аминокислотные остатки не оказывали влияния на ферментативные свойства α -AlNaGal, поэтому стадией их удаления можно пренебречь. Оптимум pH определяли в 20 мМ Na⁺-фосфатном и глицин-NaOH-буферах в интервалах 5.4–8.2 и 8.0–10.0 (рис. 2А). Изучение свойств α -AlNaGal показало возможность ее использования для дегликозилирования групповых детерминант А-эритроцитов крови (станция переливания крови, Владивосток) при нейтральных значениях pH. Отмытые физиологическим раствором А-эритроциты доводили изотоническим Na⁺-фосфатным буфером до концентрации 20%, 0.02 мл полученной суспензии смешивали с 0.08 мл раствора α -AlNaGal (0.004 U) в том же буфере. После 24 ч инкубации при 26°C эритроциты отмывали 3 раза с легким перемешиванием в том же буфере (pH 7.3), и готовили 1% суспензию, затем смешивали с анти-А-сывороткой (ООО «Медиклон», Россия) в сериях двойных разведений на 96-луночных планшетах (Costar). Спустя 1 ч инкубации при комнатной температуре считывали титр агглютинации (рис. 2Б). Результаты иммунологического анализа показали, что серологическая активность А-антигенов эритроцитов, обработанных α -AlNaGal, снизилась

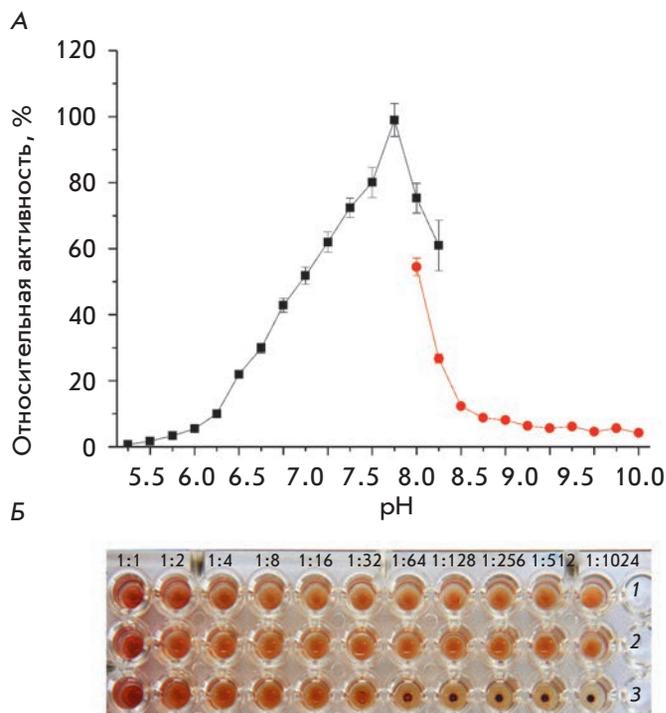


Рис. 2. Ферментативные свойства α -A/NaGal: А – pH-оптимум α -A/NaGal; Б – 1% суспензия А-эритроцитов, смешанных с анти-А-сывороткой, в сериях двойных разведений: 1 – в 20 мМ Na⁺-фосфатном буферном растворе, 2 – в 20 мМ глицин-NaOH-буферном растворе, 3 – в 20 мМ Na⁺-фосфатном буферном растворе после обработки α -A/NaGal

в результате их ферментативной трансформации в Н-антигены, так как агглютинации не наблюдается до титра 1/16. α -A/NaGal не вызывает неспецифической агрегации эритроцитов и их гемолиза.

По способности полностью инактивировать серологическую активность А-эритроцитов при нейтральных значениях pH фермент из морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T выгодно отличается от α -N-ацетилгалактозаминидаз из печени цыпленка и *S. perfringens*, действующих только на А₂-эритроциты [5, 6]. Ферменты GH27 и GH36, как классические гликозидгидролазы, катализируют гидролиз О-гликозидной связи субстрата по механизму двойного замещения с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата [10]. Позднее из патогенной бактерии *Elizabethkingia meningoseptica* был выделен фермент нового семейства GH109, подобный по свойствам α -N-ацетилгалактозаминидазе *A. latericius* КММ 426^T, но имеющий иной механизм гидролиза [8]. Этот механизм включал стадии элиминирования

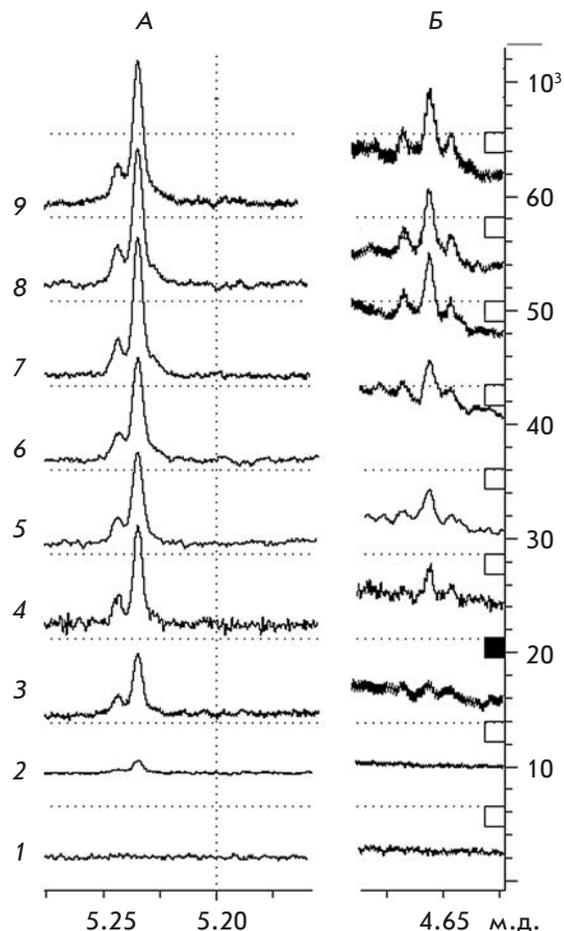


Рис. 3. Область резонанса $\Delta\delta = 5.30$ – 5.20 м.д. (А) и $\Delta\delta = 4.75$ – 4.10 м.д. (Б) α - и β -аномерных атомов ¹H-ЯМР-спектра продукта гидролиза α -A/NaGal – N-ацетилгалактозамина, в течение 0 (1), 10 (2), 20 (3), 30 (4), 40 (5), 50 (6), 80 (7), 90 (8), 100 мин (9)

О-гликозидной связи и обмен протона во втором положении N-ацетилгалактозамина с сохранением аномерной конфигурации.

Прямое наблюдение конфигурации аномерного центра продуктов гидролиза α -A/NaGal осуществляли с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Эксперимент проводили при 20°С с использованием ЯМР DRX-500-спектрометра (Bruker). ¹H-ЯМР-спектры были получены при ширине 5000 Гц, TD – 32000. Перед анализом 0.6 мл 50 мМ Na⁺-фосфатного раствора, pH 7.5, содержащего 6.0 мМ субстрата *n*-нитрофенил-N-ацетилгалактозаминида, высушивали на роторном испарителе и растворяли в 0.6 мл D₂O. Дейтерированную α -A/NaGal получали на колонках Vivaspin турбо 10 К MWCO (Sartorius). Химические сдвиги в спектре измеря-

ли по отношению к внутреннему стандарту – ацетону ($\delta = 2.22$ м.д.) в D_2O . После записи исходного спектра субстрата при $\tau = 0$ мин к 6.0 мМ дейтерированного *n*-нитрофенилгалактозаминида в 0.6 мл D_2O для иницирования реакции добавляли 0.1 мл дейтерированной α -AlNaGal, содержащей 0.98 U. 1H -ЯМР-спектры регистрировали автоматически с интервалом в 10 мин в течение 180 мин от начала реакции. На рис. 3 представлены области резонанса $\Delta\delta = 5.30$ –5.20 м.д. и $\Delta\delta = 4.75$ –4.10 м.д. 1H -ЯМР-спектра продуктов реакции. В течение первых минут после добавления фермента появляется продукт, имеющий резонансный сигнал с химическим сдвигом при 5.22 м.д. (рис. 3А). Этот сигнал соответствует протону аномерного центра свободного α -N-ацетилгалактозамина (GalNAc α). Интенсивность сигнала увеличивается в течение следующих 10 мин реакции. Сигнал β -аномера GalNAc α с химическим сдвигом 4.64 м.д. как результат мутаротации становится заметным спустя 20 мин от начала реакции (рис. 3Б). Как видно из спектра α - и β -аномеров сво-

бодного GalNAc α сигналы проявляются в виде дублетов с КССВ $J = 3.8$ и 7.8 Гц и синглета, что указывает на замещение протона дейтерием по атому C2, что характерно для гликозидгидролаз GH109 [8, 11].

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный белок α -AlNaGal с молекулярной массой 164 кДа, обладающий свойствами α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T. α -AlNaGal катализирует гидролиз α -O-гликозидной связи с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата и обменом протона при C2 на дейтерий растворителя по типу гликозидгидролаз GH109. α -AlNaGal дегликозилирует А-антигены крови при pH 7.5, что делает ее в перспективе пригодной для получения эритроцитов группы крови O. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 13-04-00806) и Научным фондом ДВФУ (14-08-06-10_у).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vallée F, Karaveg K, Herscovics A, Moremen K.W, Howell P.L. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 52. P. 41287–41298.
- Keulemans J.L.M., Reuser A.J.J., Kroos M.A., Willemsen R., Hermans M.M.P., van den Ouweland A.M.W., de Jong J.G.N., Wevers R.A., Renier W.O., Schindler D., et al. // J. Med. Genet. 1996. V. 33. № 6. P. 458–464.
- Olsson M.L., Hill C.A., de la Vega H., Liu Q.P., Stroud M.R., Valdinocci J., Moon S., Clausen H., Kruskall M.S. // Transfus. Clin. Biol. 2004. V. 11. № 1. P. 33–39.
- Hata J., Dhar M., Mitra M., Harmata M., Haibach P., Sun P., Smith D. // Biochem. Int. 1992. V. 28. № 1. P. 77–86.
- Hsieh H.Y., Smith D. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2003. V. 37. № 2. P. 157–163.
- Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Горшкова Н.М., Михайлов В.В., Елякова Л.А. // Биология моря. 1998. Т. 24. № 6. С. 351–358.
- Бакунина И.Ю., Кульман Р.А., Лихошерстов Л.М., Мартынова М.Д., Недашковская О.И., Михайлов В.В., Елякова Л.А. // Биохимия. 2002. Т. 67. № 6. С. 830–837.
- Liu Q.P., Sulzenbacher G., Yuan H., Bennett E.P., Pietz G., Saunders K., Spence J., Nudelman E., Levery S.B., White T., et al. // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. № 4. P. 454–464.
- Bakunina I., Nedashkovskaya O., Balabanova L., Zvyagintseva T., Rasskasov V., Mikhailov V. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 1977–1998.
- Comfort D.A., Bobrov K.S., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Harris J.M., Kulminskaya A.A., Brumer H., Kelly R.M. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 11. P. 3319–3330.
- Chakladar S., Abadib S.S.K., Bennet A.J. // Med. Chem. Commun. 2014. V. 5. P. 1188–1192.

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 сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – 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

ДЛЯ СТУДЕНТОВ, МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И ИННОВАТОРОВ

INNOSTAR

ПРИСОЕДИНЯЙСЯ! СТАНЬ ЗВЕЗДОЙ НАУКИ И ИННОВАЦИЙ!

INNOSTAR

ОРГАНИЗАТОРЫ:



ДЕПАРТАМЕНТ НАУКИ,
ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОЛИТИКИ
И ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬСТВА
ГОРОДА МОСКВЫ



WWW.INNOSTAR.RU