

Письмо редакторов

Дорогие читатели журнала! Вы смотрите последний выпуск 2014 года. С чем мы входим в Новый год? Мы даем нашим авторам неоспоримые преимущества: бесплатно переводим и публикуем в открытом доступе полноразмерные статьи с цветными иллюстрациями. Серьезное реферирование (как минимум, две рецензии профильных специалистов), индексирование в PubMed, Scopus, Web of Science, РИНЦ привели к хорошим результатам. Мы уже писали о достижении значения импакт-фактора 0.872. Работа журнала была отмечена в этом году премией Thomson Reuters Awards MIPR for Increase in Scientific Productivity. Мы получили приз в номинации «Восходящая звезда» (rising star). Безусловно, это обязывает. Мы не проводим работу по искусственному повышению импакт-фактора журнала. Наше единственное оружие – это повышение уровня рецензирования и отбор статей. Как отмечалось, нам пришлось ввести предварительное рецензирование на уровне редколлегии до стадии отправки материала двум специалистам. Это дает результаты. В этом году мы также решили стать еще ближе к научной общественности, особенно к молодежной аудитории. Мы решили присуждать дипломы молодым ученым – победителям конкурсов на лучший постер, проводимых в рамках серьезных отечественных конференций по профилю журнала. Так, победите-

ли конкурса на IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», проходившей 29 октября – 1 ноября 2014 года в Казани, уже получили свои дипломы. Пользуясь случаем, хотим поблагодарить организаторов этого конкурса Марину Викторовну Третьяк и Вадима Марковича Говоруна за большую проделанную работу. Победители конкурса получили приглашения представить свои работы в форме кратких сообщений, которые, естественно, пройдут раунд рецензирования. География мест, где работают победители, разнообразна. Это – Москва, Нижний Новгород, Казань, Новосибирск. Давайте пожелаем молодым исследователям успехов и ждем их статей!

По традиции номер открывается приглашенным обзором, посвященным механизму работы ионных каналов (Гризель с соавт.), и продолжается экспериментальной статьей на эту тематику (Вигонт с соавт.). Эта тематика перекликается с экспериментальными работами номера (Ефимова с соавт., Челомбитко с соавт. и Гайдуков с соавт.). Мы продолжаем интересоваться вопросами врожденного иммунитета, причем с учетом возможной фармацевтической направленности (Багаев с соавт. и Шамова с соавт.). В этом номере две статьи также фармакологической направленности посвящены флуоресцентной визуализации (Гребеник с соавт., Терехов с соавт.). В номере опубликована весьма интересная синтетическая работа из Новосибирска, посвященная фосфорилгуанидинам (Купрюшкин с соавт.). Новое семейство актинопопинов представлено в работе Лейченко с соавт. Традиционно сильно представлены ЯМР-исследования и расчетные работы (Люкманова с соавт.).

В заключение разрешите всех поздравить с Новым годом и пожелать новых научных достижений! ●

Редколлегия



ДЛЯ СТУДЕНТОВ, МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И ИННОВАТОРОВ

INNOSTAR

ПРИСОЕДИНЯЙСЯ! СТАНЬ ЗВЕЗДОЙ НАУКИ И ИННОВАЦИЙ!



ОРГАНИЗАТОРЫ:



ДЕПАРТАМЕНТ НАУКИ,
ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОЛИТИКИ
И ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬСТВА
ГОРОДА МОСКВЫ

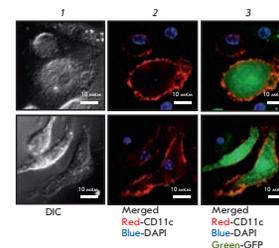


WWW.INNOSTAR.RU

Регуляция экспрессии целевого белка (трансгена) в составе ДНК аденовирусного вектора с помощью агонистов Toll-подобных рецепторов

А. В. Багаев, А. В. Пичугин, Е. С. Лебедева, А. А. Лысенко, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, Б. С. Народицкий, Р. И. Атауллаханов, Р. М. Хаитов, А. Л. Гинцбург

В работе показано, что агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR), в частности TLR2, 4, 5, 7, 8 и 9, усиливают продукцию целевого белка в клетках, трансдуцированных рекомбинантным аденовирусным вектором (rAd), кодирующим этот целевой белок. Усиление реализуется в дендритных клетках и макрофагах, экспрессирующих цитоплазматический, мембранный или секреторный целевые белки. Агонист TLR3 подавляет продукцию целевых белков, закодированных в rAd. Обсуждается роль сигнальных путей MyD88 → NF-κB и TRIF → IRF соответственно в активации и подавлении продукции белка, кодируемого трансгеном в составе rAd.



Конфокальная микроскопия дендритных клеток, трансдуцированных rAd-GFP

Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов

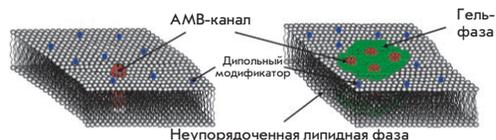
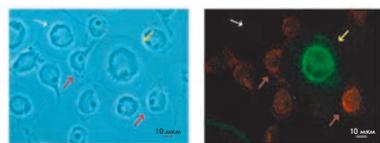


Схема микроокружения АМВ-каналов в мембранах с различной концентрацией полиенового антимикотика, соответствующей функционированию одиночных каналов и интегральному мультиканальному току

С. С. Ефимова, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

Работа посвящена определению роли различных мембранных компонентов в процессах формирования и функционирования ионных каналов, образуемых противогрибковыми макролидными полиеновыми антибиотиками в модельных мембранах. В качестве инструментов исследования применены дипольные модификаторы мембран. Обсуждается участие дипольного потенциала мембраны, полиен-стериновых и полиен-липидных взаимодействий, а также физико-химических свойств упорядоченных мембранных доменов в каналообразующей активности полиеновых макролидов.

Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе



Клетки, экспрессирующие маркер липидных рафтов GM1
Клетки, экспрессирующие маркер липидных рафтов GM1 и CD14
Клетка, не экспрессирующая ни один из маркеров

Иммуноцитохимическое окрашивание культивируемых моноцитов / макрофагов здорового субъекта

М. А. Челомбитко, В. С. Шишкина, О. П. Ильинская, А. И. Каминный, Т. О. Павлунина, Н. Н. Самовилова, Е. В. Грачева, Э. М. Тарарак, Н. В. Проказова

С целью выяснения возможного механизма преактивации циркулирующих в крови моноцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии проведено сравнительное изучение мембранных рафтов различных субпопуляций моноцитов в крови больных атеросклерозом в сравнении со здоровыми донорами. Сделано предположение, что при атеросклерозе моноциты периферической крови накапливают ганглиозиды, которые используются ими после миграции в интиму артерий для формирования мембранных рафтов при их дифференцировке в макрофаги.

Acta Naturae

ТОМ 6, № 4 (23), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2014

Учредители:

Министерство образования и науки РФ,
Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
ООО «Парк-медиа»

Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев
Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре
Издатель: К.В. Киселев

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Беспрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
К. Нирхауз (Берлин, Германия),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швьядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: С.Б. Невская
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректура: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.
Телефон/факс: +7 (495) 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, 2014

Номер подписан в печать 11 ноября 2014 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

А. Е. Воинов, И. Б. Хлебников, Ш. А. Джабраилов
Реформирование действующего порядка
законодательного регулирования ввоза
и вывоза материалов для научных
исследований..... 6

ОБЗОРЫ

А. В. Гризель, Г. С. Глухов, О. С. Соколова
Механизмы активации потенциал-
управляемых калиевых каналов..... 12

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. В. Багаев, А. В. Пичугин, Е. С. Лебедева,
А.А. Лысенко, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов,
Б. С. Народицкий, Р. И. Атауллаханов,
Р. М. Хаитов, А. Л. Гинцбург
Регуляция экспрессии целевого белка
(трансгена) в составе ДНК аденовирусного
вектора с помощью агонистов Toll-подобных
рецепторов..... 29

СОДЕРЖАНИЕ

В. А. Вигонт, О. А. Зимина, Л. Н. Глушанкова,
Ю. А. Колобкова, М. А. Рязанцева,
Г. Н. Можяева, Е. В. Казначеева

Белок STIM1 активировывает депо-управляемые кальциевые каналы в клетках-моделях болезни Хантингтона 43

Е. А. Гребеник, А. Н. Генералова, А. В. Нечаев,
Е. В. Хайдуков, К. Е. Миронова,
О. А. Стрёмовский, Е. Н. Лебеденко,
А. В. Звягин, С. М. Деев

Специфическая визуализация опухолевых клеток с помощью антистоксовых нанофосфоров 51

С. С. Терехов, И. В. Смирнов, О. Г. Шамборант,
М. А. Зенкова, Е. Л. Черноловская, Д. В. Гладких,
А. Н. Мурашев, И. А. Дьяченко, В. Д. Кнорре,
А. А. Белогуров, Н. А. Пономаренко,
С. М. Деев, В. В. Власов, А. Г. Габиров

Создание высокоэффективного флуоресцентного зонда для изучения биодegradации фармакологических белковых препаратов *in vivo* 58

Е. Н. Люкманова, М. А. Шулепко, М. Л. Бычков,
З. О. Шенкарев, А. С. Парамонов, А. О. Чугунов,
А. С. Арсеньев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, действующие на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, замедляют пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29 64

С. С. Ефимова, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова
Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов 72

М. А. Челомбитко, В. С. Шишкина,
О. П. Ильинская, А. И. Каминный,
Т. О. Павлунина, Н. Н. Самовилова, Е. В. Грачева,
Э. М. Тарарак, Н. В. Проказова

Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе . . 86

Е. В. Лейченко, М. М. Монастырская,
Е. А. Зелепуга, Е. С. Ткачева, М. П. Исаева,
Г. Н. Лихацкая, С. Д. Анастюк, Э. П. Козловская

Hct-A – новое семейство актинопоринов актинии *Heteractis crispa* 95

О. В. Шамова, Д. С. Орлов, С. В. Баландин,
Е. И. Шрамова, Е. В. Цветкова, П. В. Пантелеев,
Ю. Ф. Леонова, А. А. Тагаев, В. Н. Кокряков,
Т. В. Овчинникова

Аципенсины – новые антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* 105

А. Е. Гайдуков, П. О. Богачева, Е. О. Тарасова,
О. П. Балезина

Механизм подавления холином выброса ацетилхолина в моторных синапсах мыши . 117

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

М. С. Купрюшкин, Д. В. Пышный,
Д. А. Стеценко

Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот 123

Правила для авторов 126

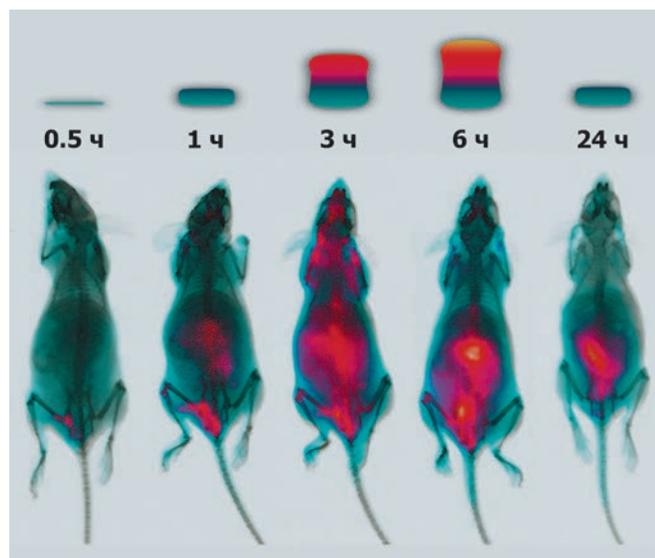


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Терехова и др.)

УДК 342.9

Реформирование действующего порядка законодательного регулирования ввоза и вывоза материалов для научных исследований

А. Е. Воинов, И. Б. Хлебников, Ш. А. Джабраилов*

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий»

*E-mail: s.jabrailov@skoltech.ru

Действующий порядок ввоза и вывоза материалов для научных исследований не позволяет обеспечить их оперативную поставку, что приводит к снижению результативности научно-исследовательских работ, проводимых российскими научными и образовательными организациями. Предлагается на законодательном уровне установить упрощенную процедуру ввоза и вывоза материалов для научных исследований путем введения единого разрешительного документа, требуемого для ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований.

В условиях перехода к инновационной модели развития в России проводятся реформы, нацеленные на стимулирование научно-исследовательской деятельности, повышение результативности научно-исследовательских проектов. Как известно, наряду с другими факторами, возможность оперативной поставки материалов и оборудования, необходимых для организации и проведения научных исследований, является одним из основополагающих факторов, обуславливающих успешность и результативность исследовательских работ. В последние годы все чаще можно услышать мнение ведущих российских ученых и экспертов о том, что действующий порядок ввоза (вывоза) материалов для научных исследований не позволяет обеспечить их оперативную поставку, что приводит к снижению эффективности научно-исследовательских работ, проводимых российскими научными

и образовательными организациями, ограничивает возможности участия российских ученых в международных научно-исследовательских проектах. В частности, среди основных проблем выделяется наличие избыточного правового регулирования (множественность правовых норм по одним и тем же вопросам) вопросов ввоза (вывоза) биологических материалов, в том числе биологических материалов человека, реактивов и лабораторных животных (далее – материалы для научных исследований), что вызывает необходимость прохождения большого количества согласовательных процедур с целью получения разрешительных документов, необходимых для ввоза (вывоза) материалов (лицензий, ветеринарных сертификатов и т.д.).

На данном этапе рабочая группа Сколковского института науки и технологий (далее – рабочая группа) разработала рекомендации по совершенствованию теку-

щего порядка ввоза (вывоза) материалов для научных исследований и диагностики.

Представляется целесообразным регулировать вопросы ввоза (вывоза) материалов на основе комплексного подхода, предполагающего установление упрощенной процедуры ввоза (вывоза) материалов для научных исследований путем введения единого разрешительного документа, требуемого для ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований, действующего бессрочно в отношении указанных в нем типов материалов для научных исследований и классов (уровней) их опасности (патогенности), сокращения сроков выпуска указанных материалов, применения к отдельным категориям материалов для научных исследований на основании статьи 178 Таможенного кодекса Таможенного союза специальных упрощений, предусмотренных

статьей 197 Таможенного кодекса Таможенного союза [1] в части выпуска товаров до подачи таможенной декларации, создания возможности применения к материалам для научных исследований упрощенного порядка декларирования, аналогичного предусмотренному статьями 279 и 283 Федерального закона «О таможенном регулировании в Российской Федерации» [2] в отношении коммерческих и научных образцов.

Наряду с этим необходимо обеспечить последующий контроль за целевым использованием научными и образовательными организациями материалов для научных исследований, ввезенных на территорию Российской Федерации в соответствии с упрощенной процедурой. В этой связи представляется целесообразным введение механизма контроля, включающего в себя следующие элементы:

- государственную аккредитацию организаций, имеющих право использовать упрощенную процедуру ввоза (вывоза) материалов для научных исследований, и создание реестра аккредитованных научных организаций и образовательных организаций, установление требований к указанным организациям, в том числе в части разработки и внедрения аккредитованными научными организациями и образовательными организациями внутренних программ контроля материалов для научных исследований;
- установление требований к отчетности аккредитованных научных и образовательных организаций и механизмов контроля целевого использования материалов для научных исследований со стороны уполномоченных федеральных органов исполнительной власти;
- идентификацию новых материалов для научных исследова-

ний, классификацию материалов для научных исследований по классам (уровням) опасности (патогенности), создание реестра материалов для научных исследований;

- установление ответственности за нецелевое использование материалов для научных исследований.

Предлагается следующий порядок применения научными организациями и образовательными организациями упрощенного порядка ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований:

- Уполномоченный федеральный орган исполнительной власти (далее – УФОИВ) организует государственную аккредитацию научных и образовательных организаций – участников внешнеэкономической деятельности, создавших внутренние программы контроля материалов для научных исследований, и выдачу аккредитованным организациям единого разрешения на ввоз в Российскую Федерацию и вывоз из Российской Федерации материалов для научных исследований для целей осуществления научной и (или) научно-практической деятельности и (или) экспериментальных разработок (далее – единого разрешения), а также ведение реестра аккредитованных организаций;
- УФОИВ принимает решение о государственной аккредитации научных и образовательных организаций на основе заявлений в случае их удовлетворения установленным требованиям. При государственной аккредитации УФОИВ выдает научной или образовательной организации единое разрешение на ввоз (вывоз) по упрощенной процедуре материалов для научных исследований с указанием типа

материалов и класса их опасности;

- аккредитованные научные организации и образовательные организации вправе осуществлять ввоз в Российскую Федерацию и вывоз из Российской Федерации материалов для научных исследований на основе имеющегося у них единого разрешения, без предоставления каких-либо дополнительных разрешительных документов (за исключением лицензий и разрешений, выдаваемых в порядке, установленном законодательством Российской Федерации о наркотических средствах, психотропных веществах и их прекурсорах (кроме прекурсоров, внесенных в Таблицу III Списка IV [3]), а также ветеринарных и фитосанитарных сертификатов);
- научные организации и образовательные организации берут на себя обязательство использования материалов исключительно в целях научных исследований и экспериментальных разработок, без права передачи третьим лицам на возмездной или безвозмездной основе (за исключением передачи материалов для научных исследований в рамках научной кооперации, с сохранением контроля за их целевым использованием);
- научные организации и образовательные организации, пользующиеся упрощенным порядком ввоза (вывоза) материалов для научных исследований, предоставляют в УФОИВ отчетность о фактически ввезенных (вывезенных) материалах и их расходовании. УФОИВ проводит регулярные проверки контроля целевого использования материалов (при необходимости, с привлечением иных компетентных федеральных органов исполнительной власти). Также представляется целесо-

образным создание федерального информационного ресурса по тематике ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований, которая будет содержать полную и структурированную информацию о нормативных правовых актах в области ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований, в том числе о названии нормативного правового акта, его предмете и об издании,

в котором такой акт опубликован, а также информация о порядке присвоения материалам для научных исследований кодов Товарной номенклатуры внешнеэкономической деятельности, иную нормативную, справочную и аналитическую информацию, относящуюся к ввозу в Российскую Федерацию и вывозу из Российской Федерации материалов для научных исследований.

Совершенствование текущего порядка ввоза (вывоза) материалов для научных исследований,

основанное на предложенных рекомендациях, позволит заложить основу для значительного сокращения сроков ввоза (вывоза) материалов для научных исследований и, как следствие, повысить эффективность и результативность научных исследований, проводимых российскими научными и образовательными организациями, расширить возможности участия отечественных ученых в исследовательских проектах, организованных в рамках международной научной кооперации. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Таможенный кодекс Таможенного союза (приложение к Договору о Таможенном кодексе Таможенного союза, принятому Решением Межгосударственного Совета ЕврАзЭС на уровне глав государств от 27.11.2009 № 17).
2. Федеральный закон от 27.11.2010 № 311-ФЗ (ред. от 04.06.2014) «О таможенном регулировании в Российской Федерации».
3. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями).

КОММЕНТАРИИ К МАТЕРИАЛУ, ПРЕДСТАВЛЕННОМУ РАБОЧЕЙ ГРУППОЙ «СКОЛКОВСКОГО ИНСТИТУТА НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ»

Журнал *Acta Naturae* вновь решил обратить внимание на проблему таможенного оформления материалов для научных исследований (АН. 2010. Т. 2. № 2(5)). Дискуссионный материал, подготовленный «Сколтехом», достаточно подробно излагает «возможную формализацию» таможенной «очистки» грузов для научных исследований. Со времени первой публикации в нашем журнале и моего выступления на совете 11 марта 2011 года, проходившем под председательством Дмитрия Анатольевича Медведева, проблем в сфере обеспечения отечественных ученых продукцией высокотехнологических производств из-за рубежа только прибавилось. Абсолютно очевидно, что российский исследователь вынужден покупать реактивы и приборы из-за рубежа на 50%, а иногда на 100% дороже и ждать их получения иногда в течение месяца-двух. Проблема носит системный характер. Российский рынок невелик, и крупным игрокам научной индустрии обычно невыгодно держать солидные многопрофильные склады на территории РФ. Как может государство помочь отечественным исследователям, не занимающимся коммерческой деятельностью, да, впрочем, и научным компаниям, извлекающим прибыль из научной деятельности?

(Последние, кстати, не получили должного внимания в статье «Сколтеха».) Представленный в публикации материал, на мой взгляд, несколько излишне «заорганизован». Есть четкая проблема таможенных кодов. Все товары, предназначенные для высокотехнологичной деятельности, способствующие развитию потенциала страны, должны иметь определенный знак внутри таможенных справочников. Это большая работа, но для ее проведения нужен пул квалифицированных специалистов. Проверка проста – импорт этих товаров по группам достаточно ограничен по объемам поставок и «пересортицы», т.е. использования «научных» кодов для провоза регулярных промышленных товаров можно избежать. Особое внимание надо уделить продуктам, требующим специальных условий хранения, например глубокого низкотемпературного режима (например, клеточные линии). Такие продукты также должны найти «особый статус» в таможенных справочниках с соответствующими нормативными требованиями по условиям и временным лимитам таможенной очистки. Невыполнение этих требований повлечет наказание таможенных чиновников, ответственных за нарушение в установленном порядке. Как быть с сертификатами «опасной» химической или биологической научной продукции? Необходимо законодательно закрепить «службу одного окна» на таможенных терминалах. В этой службе должны быть высококлассные специалисты со специ-

альным образованием, способные принимать адекватные решения согласно установленной логистике. Должны быть выработаны сертификаты, соответствующие международным правилам, не допускающие двусмысленного толкования. Отсутствие подобной службы на конкретном терминале должно приводить к его временному закрытию. Это избавит от хождения по различным ведомствам и реально ускорит оформление грузов. А как быть с «научным экспортом», т.е., например, отсылкой каких-то генетических конструкторов или белков, а может быть, пробных материалов своим коллегам за рубеж для проведения совместных исследований? Здесь очевидно необ-

ходимо создать незабюрократизированную систему «таможенной сертификации» в системе ФАНО, Минздрава, Минобрнауки, федеральных университетов. Выданный сертификат должен являться основанием для таможенной очистки «на экспорт». Главное – необходимо на всех этапах работать с грамотными специалистами, а не с людьми, которые пытаются «отгораживаться» от проблемы в связи с отсутствием знаний и понимания ситуации. При этом надо понимать, что нарушения все равно будут, но для этого существуют правоохранительные органы. ●

Александр Габиров

Редколлегия журнала *Acta Naturae* попросила представителей Sigma-Aldrich прокомментировать статью Воинова и его коллег из «Сколтеха». Sigma-Aldrich является одним из крупнейших импортеров в Россию материалов для химических и биологических исследований собственного производства. В Sigma-Aldrich прокомментировали, в частности, такие аспекты, затронутые в статье, как избыточность правового регулирования вопросов ввоза (вывоза) биологических материалов, сроки оформления материалов на таможне и ряд других.

В последние годы все чаще можно услышать мнение ведущих российских ученых и экспертов о том, что действующий порядок ввоза (вывоза) материалов для научных исследований не позволяет обеспечить их оперативную поставку, что приводит к снижению эффективности научно-исследовательских работ, проводимых российскими научными и образовательными организациями, ограничивает возможности участия российских ученых в международных научно-исследовательских проектах.

В настоящий момент время оформления материалов для лабораторных исследований на специализированном таможенном посту составляет 1–2 дня, если не требуется дополнительных разрешительных документов.

В частности, среди основных проблем выделяется наличие избыточного правового регулирования (множественность правовых норм по одним и тем же вопросам) вопросов ввоза (вывоза) биологических материалов, в том числе биологических материалов человека, реактивов и лабораторных животных.

«Избыточность» в вопросах правового регулирования в данной области объясняется тем, чтобы не допустить ввоз в страну потенциально опасных

для жизни людей материалов. А данная группа товаров представляет повышенную опасность, поэтому наличие большого количества разрешительных документов здесь совершенно оправданно. Кроме того, в отдельных кодах ЕТН ТНВЭД уже заложены преференции в описании – если указано «для лабораторных исследований», то продукт разрешается к ввозу без дополнительных разрешений.

На данном этапе рабочая группа Сколковского института науки и технологий (далее – рабочая группа) разработала рекомендации по совершенствованию текущего порядка ввоза (вывоза) материалов для научных исследований и диагностики.

Ввести единый разрешительный документ не представляется возможным, потому что этих материалов слишком много и они постоянно обновляются (каталог Сигмы более 300000), они могут относиться к совершенно разным товарным группам и, потенциально, относятся к товарам повышенного риска, требующим особого внимания при импорте в РФ.

Государственную аккредитацию организаций, имеющих право использовать упрощенную процедуру ввоза (вывоза) материалов для научных исследований, и создание реестра аккредитованных научных

организаций и образовательных организаций, установление требований к указанным организациям, в том числе в части разработки и внедрения аккредитованными научными организациями и образовательными организациями внутренних программ контроля материалов для научных исследований.

Как правило, материалы для лабораторных исследований завозят в страну ТОРГОВЫЕ, а не научные организации. Научные организации, не являясь участниками ВЭД, покупают эти материалы у организации импортера. Поэтому можно было бы скорее говорить о создании государственной аккредитации ИМПОРТЕРОВ материалов для лабораторных исследований.

Уполномоченный федеральный орган исполнительной власти (далее – УФОИВ) принимает решение о государственной аккредитации научных и образовательных организаций на основе заявлений в случае их удовлетворения установленным требованиям. При государственной аккредитации УФОИВ выдает научной или образовательной организации единое разрешение на ввоз (вывоз) по упрощенной процедуре материалов для научных исследований с указанием типа материалов и класса их опасности.

Невозможно одним разрешением на ввоз охватить каталог в 300000 материалов для научных исследований, который, к тому же, постоянно расширяется. Данное разрешение по одному унифицированному коду крайне осложнит и сделает практически невозможным дальнейшее отслеживание судьбы этих материалов на территории РФ с целью определения их це-

левого (нецелевого) использования, не говоря о том, что может содействовать преступному замыслу.

Научные организации и образовательные организации берут на себя обязательство использования материалов исключительно в целях научных исследований и экспериментальных разработок, без права передачи третьим лицам на возмездной или безвозмездной основе (за исключением передачи материалов для научных исследований в рамках научной кооперации, с сохранением контроля за их целевым использованием).

В случае унификации осуществлять такой контроль не представляется возможным, по причинам, описанным выше.

Также представляется целесообразным создание федерального информационного ресурса по тематике ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации материалов для научных исследований.

Данный ресурс уже имеется на любой таможне, любым таможенным посту и у любого таможенного декларанта в специализированной таможенной программе. Он предоставляет полную информацию о ЕТН ВЭД и правовых актах ВЭД, а также является информационной базой данных по всем импортируемым—экспортируемым товарам. При необходимости можно создать отдельный сайт и копировать информацию оттуда. ●

**Андрей Зубков,
директор по логистике и ВЭД
Sigma-Aldrich, Россия**

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*

УДК 577.322

Механизмы активации потенциал-управляемых калиевых каналов

А. В. Гризель¹, Г. С. Глухов², О. С. Соколова^{2*}¹Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 04.04.2014

После доработки 22.08.2014

РЕФЕРАТ Калиевые потенциал-управляемые каналы (Kv) играют важную роль в разнообразных клеточных процессах, таких, как функционирование возбудимых клеток, регуляция апоптоза, клеточной дифференцировки и роста, выделение нейротрансмиттеров, гормонов, обеспечение сердечной деятельности и др. Нарушение функционирования Kv-каналов приводит к тяжелым наследственным заболеваниям и развитию опухолей, в том числе злокачественных. Понимание механизмов функционирования Kv-каналов – ключевой фактор для определения причин заболеваний, связанных с мутациями каналов, и поиска новых лекарственных средств. Механизм активации каналов – тема продолжающихся дебатов, и консенсус в этом вопросе пока не достигнут. В данном обзоре рассмотрены ключевые этапы изучения механизмов функционирования Kv-каналов и описаны основные модели их активации, известные к настоящему времени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активация, калиевые ионные каналы, моделирование, структура.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Kv – потенциал-управляемый калиевый канал; а.о. – аминокислотный остаток; VSD – домен, чувствительный к изменению потенциала; ВСМ – модель вращающихся спиралей; ТМА – транспортная модель активации; ЛМ – лопастная модель; СДС – модель согласованного движения спиралей; КМ – консенсусная модель; МПЗ – модель перемещения зарядов; МДК – модель деактивации Kv-каналов; ММд – механистическая модель активации/деактивации Kv-канала; FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии флуоресценции; ММ – молекулярное моделирование; ЦПЗ – центр переноса зарядов; ВК – воротный канал; МД – молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки составляют ~30% всех белков организма, при этом около половины из них – белки-переносчики и ионные каналы. Калиевые ионные каналы – самый разнообразный и широко распространенный класс мембранных белков [1]. Они подразделяются в зависимости от принципа функционирования и на основании первичной структуры каналформирующей субъединицы на каналы входящего выпрямления (Kir), Ca²⁺-активируемые каналы (KCa), двупоровые (K2P) и потенциал-управляемые (Kv) каналы. Kv-каналы представляют собой наиболее разнообразную группу (рис. 1), представленную 12 семействами: Kv1–Kv12 [2].

Все Kv-каналы играют важную регуляторную роль в разнообразных клеточных процессах. Они участвуют в функционировании возбудимых клеток [3–5], в процессах регуляции апоптоза [6], клеточной

дифференцировки и роста [7]. Правильное функционирование Kv-каналов необходимо при выделении нейротрансмиттеров [8], гормонов [9, 10], для обеспечения сердечной деятельности [11] и др.

Мутации в генах Kv-каналов приводят к различным тяжелым наследственным заболеваниям [12], таким, как глухота, эпилепсия [13], некоторые виды нарушений ритма сердца [11], вовлечены в развитие рассеянного склероза и болевого синдрома [14]. Kv-каналы связаны также с процессами возникновения и развития опухолей, в том числе злокачественных [15].

Функционирование Kv-каналов можно регулировать с помощью активаторов и блокаторов [16], поэтому они представляют собой перспективные мишени для лекарственных средств [17, 18]. В этой связи важной задачей является изучение строения и функционирования Kv-каналов.

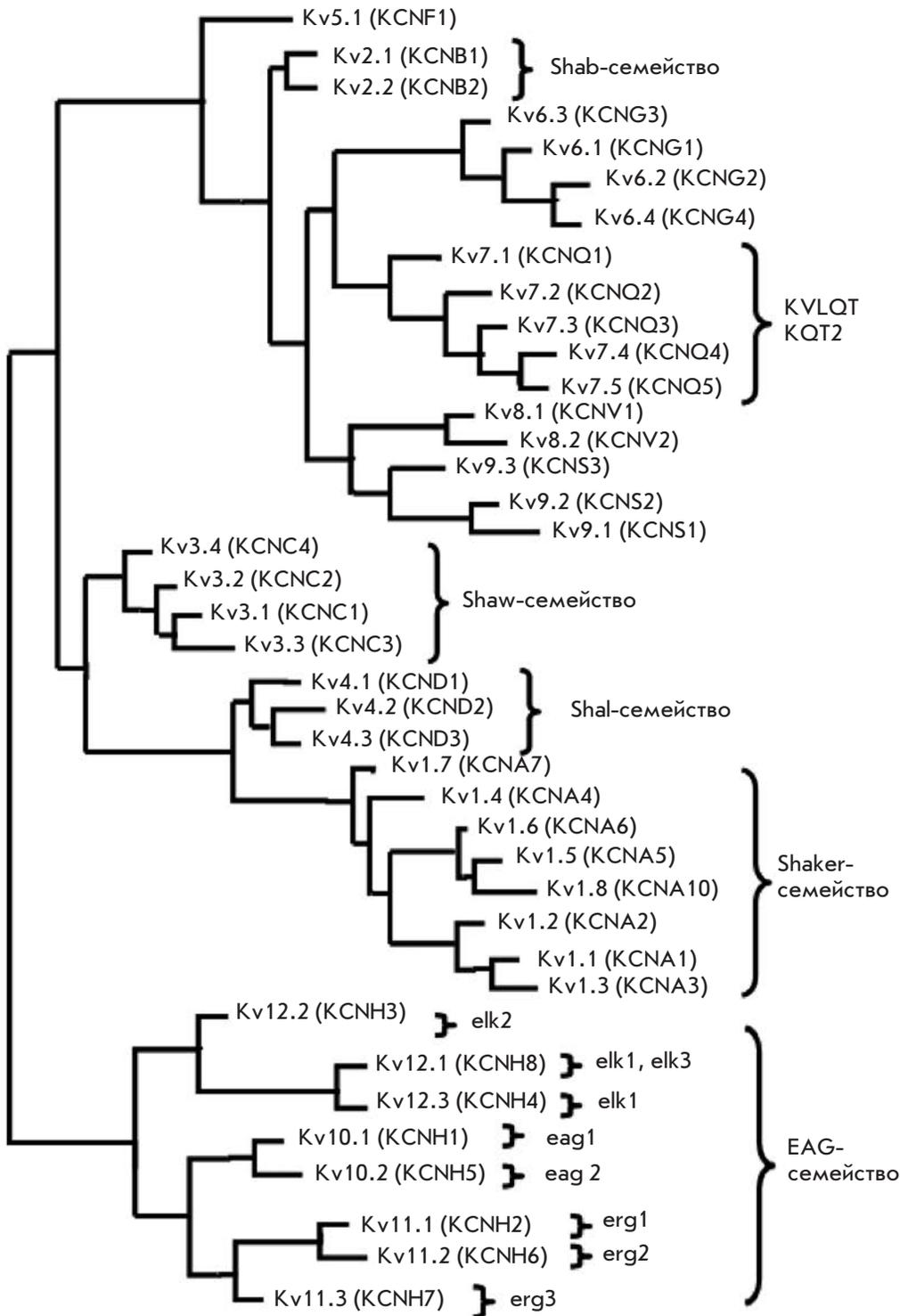


Рис. 1. Филогенетическое древо Kv-каналов, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей. Фигурными скобками объединены каналы, принадлежащие к одному семейству. Названия даны согласно системе, предложенной Международным союзом теоретической и прикладной химии (в скобках указаны альтернативные названия, согласно обозначению номенклатурного комитета при организации «Геном человека» [2])

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА Kv-КАНАЛОВ

Все Kv-каналы обладают высоким уровнем сходства. Каждый ген Kv-каналов кодирует α-субъединицу (Kvα). Для формирования функционального канала необходимы четыре α-субъединицы (рис. 2). [19, 20]. Обычно Kv-каналы представляют собой гомотетра-

меры (все Kvα идентичны) [19, 20], однако некоторые могут быть гетеротетраммерными (две или более Kvα не идентичны).

Трансмембранный домен α-субъединицы Kv-канала состоит из шести спиралей S1–S6 (рис. 2А,Б). При этом в тетрамерном канале эти спирали обра-

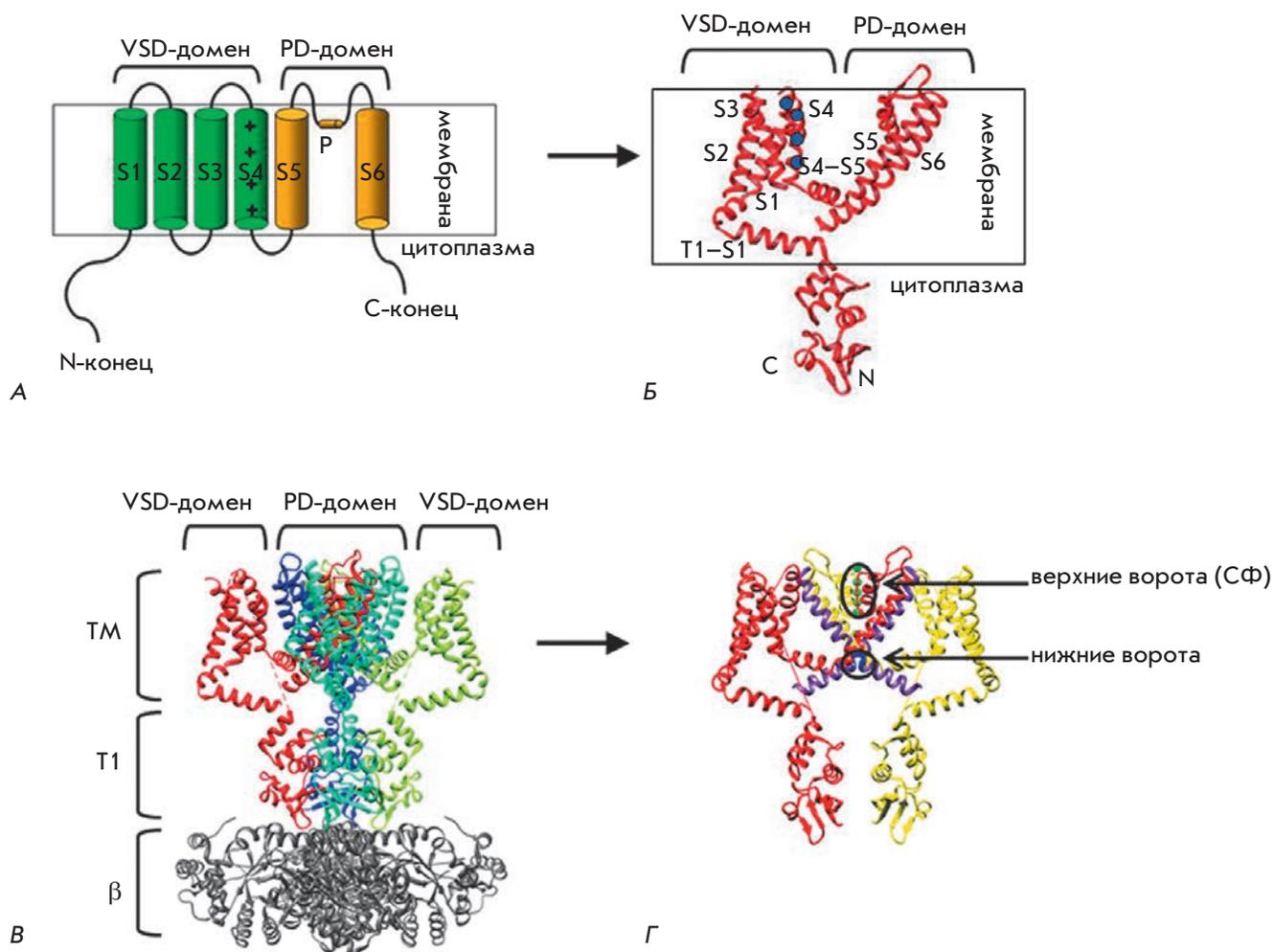


Рис. 2. Структура Kv-каналов. А – схема одной α -субъединицы Kv-канала. Трансмембранные сегменты S1–S6 и петля «Р», формирующая пору, подписаны. Заряженные Arg на сенсоре мембранного потенциала S4 обозначены плюсами. PD – поровый домен. Б – кристаллическая структура одной α -субъединицы канала Kv1.2 [21]. Подписаны сегменты S1–S6, цитоплазматический домен T1, линкер, соединяющий трансмембранную часть с доменом T1 (T1–S1), а также N- и C-концы. Заряженные Arg на сенсоре мембранного потенциала S4 обозначены синими кругами. В – кристаллическая структура канала Kv1.2 в комплексе с β -субъединицей (обозначена буквой β и выделена серым цветом) (с изменениями из [21]). ТМ – трансмембранный участок. Г – ворота канала Kv2.1. Для наглядности представлены только две противоположные субъединицы Kv α . Фиолетовым цветом показана спираль S6, синим – высококонсервативный участок спирали S6_T – PXP (ProValPro в Kv2.1), основной компонент нижних ворот. Зелеными шариками обозначены ионы K⁺, находящиеся в селективном фильтре канала (P-петля), который представляет собой верхние ворота канала

зуют две структурно и функционально различные части: 1) домен, проводящий ионы калия (поровый домен) – спирали S5–S6, расположенные в центре канала, 2) домен, чувствительный к изменению потенциала на мембране (VSD), – спирали S1–S4, расположенные на периферии канала (рис. 2Б,В).

В поровой части располагаются ворота канала, а также селективный фильтр, не позволяющий ионам, отличным от K⁺, проникать через канал. Ворота канала образованы перекрещивающимися

S-концами спиралей S6, которые при закрытии канала преграждают путь ионам [22–24]. В образовании селективного фильтра канала участвуют консервативный фрагмент (P-участок) и петля S5–S6 (рис. 2).

Известно, что VSD и поровый домен ковалентно связаны линкером S4–S5, который представляет собой амфифильную спираль, соединенную с C-концом спирали S6 (S6_T) и соседней субъединицы [21, 25–30]. В открытии/закрытии ворот канала важную роль играет высококонсервативный участок спирали S6_T,

состоящий из двух остатков Pro, разделенных чаще всего Val или другой аминокислотой – PXP (рис. 2Г). Этот участок может изгибаться, обеспечивая открытие канала [21]. Kv-каналы имеют двое ворот: (1) нижние ворота (НВ) с внутриклеточной стороны, образованные пересекающимися спиралями S6, и (2) верхние ворота (ВВ) с внеклеточной стороны канала, образованные Р-петлей селективного фильтра (рис. 2Г). У Kv-каналов, как и у большинства других калиевых каналов, НВ являются главными активационными воротами, которые контролируются внешним стимулом, таким, как мембранный потенциал. Внутренние спирали S6 пересекаются наподобие листков ирисовой диафрагмы фотоаппарата и открываются/закрываются схожим образом.

Помимо трансмембранной части, Kv-каналы имеют цитоплазматический участок, образованный N- и C-концами (рис. 2). Цитоплазматическая часть не содержит высококонсервативных участков и различается у Kv-каналов разных семейств [31].

В клетке Kv-каналы функционируют в форме больших макромолекулярных комплексов, объединяющих ионпроводящие α -субъединицы с цитоплазматическими и/или трансмембранными вспомогательными β -субъединицами, регуляторными и поддерживающими белками [32] (рис. 2В). У млекопитающих сборка порообразующих (α -) и вспомогательных субъединиц Kv-каналов происходит в эндоплазматическом ретикулуме, где они образуют стабильный комплекс [33]. α -Субъединицы формируют ионную пору, а β -субъединицы (рис. 2Б,В) и другие вспомогательные субъединицы модулируют свойства и функции α -субъединиц. Такая сложность структурных форм определяет большое разнообразие свойств и функций Kv-каналов [34].

АКТИВАЦИЯ Kv-КАНАЛОВ

Все Kv-каналы имеют сходный механизм активации. Они могут находиться в трех функциональных состояниях: состоянии покоя (закрытая конформация) ↔ активированном состоянии (открытая конформация) ↔ инактивированном состоянии (рис. 3).

В состоянии покоя канал не пропускает ионы. При деполяризации мембраны ее внутриклеточная часть становится положительной, что вызывает конформационные перестройки Kv-каналов, при этом энергетически выгодной становится открытая конформация. Эта перестройка называется активацией канала [36]. Если мембрана остается деполяризованной, то большинство Kv-каналов переходят в инактивированное непроводящее состояние. Всего описано два основных типа инактивации, N и C (рис. 3). За быстрый N-тип инактивации отвечает инактивационный пептид, свернутый в глобулу и «привя-

занный» линкером к N-концу α -субъединицы канала (α -клубок) или к β -субъединице (β -клубок) [3, 37]. Инактивационный пептид заходит в открытую пору канала и блокирует движение ионов [3, 38, 39]. При медленной инактивации (С-типа) селективный фильтр выступает в роли вторых ворот, он закрывается, препятствуя проникновению ионов [4, 40–42]. После инактивации при понижении потенциала до уровня потенциала покоя каналы полностью возвращаются в закрытую конформацию.

Механизм активации каналов остается темой дебатов. Для полного понимания вопроса необходимы знания об атомной структуре канала в разных функциональных состояниях, как минимум, в двух конечных конформациях – открытой и закрытой. Большинство кристаллических структур Kv-каналов [21, 43, 44] были получены в открытом состоянии, поэтому модели активации Kv-каналов часто создаются на основе информации о структуре, установленной с помощью различных экспериментальных подходов и молекулярного моделирования (ММ) [43, 45–53]. Подобные модели создают основу для разумных интерпретаций

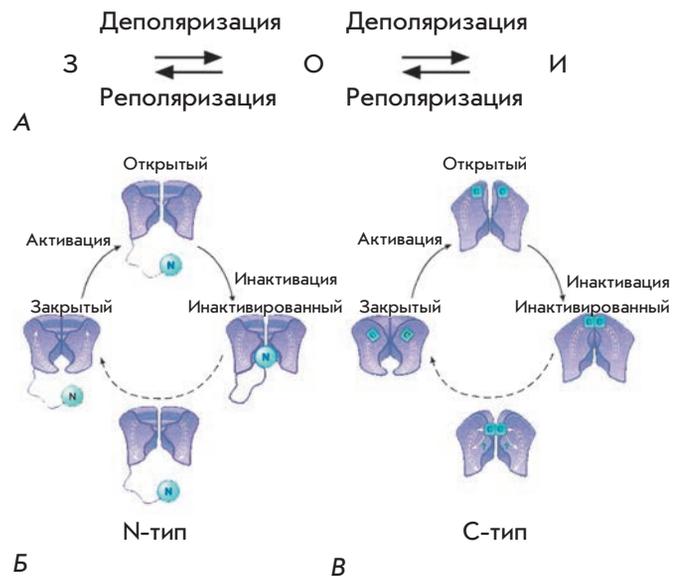


Рис. 3. А – схема конформационных переходов Kv-каналов: З – закрытый канал; О – открытый канал; И – инактивированный канал. Б – инактивация N-типа. После активации канала инактивационный пептид заходит в открытую пору канала и блокирует движение ионов. В – инактивация С-типа. Селективный фильтр выступает в роли вторых ворот и закрывается, препятствуя проникновению ионов. При понижении потенциала до уровня потенциала покоя каналы полностью возвращаются в закрытую конформацию (рисунок модифицирован из [35])

полученных результатов и дизайна дальнейших экспериментов. На сегодняшний день накоплено большое количество данных, указывающих на особенности строения Kv-каналов в открытой и закрытой конформациях. Современные модели активации все больше сходятся к единой консенсусной модели открытия канала [54–57]. Все они базируются на ранних ключевых экспериментах и моделях активации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛЕЙ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

В самых первых моделях активации Kv-каналов предполагалось, что при активации канала сенсор потенциала S4 под действием изменения трансмембранного потенциала движется вверх по каналу, который сообщается с наружным и внутренним растворами [58]. Позже стали накапливаться экспериментальные данные о функционировании Kv-каналов, которые позволили уточнить имеющиеся модели активации. К основополагающим данным, важным для расшифровки механизма активации Kv-каналов, относятся следующие:

(1) *Сегмент S4 содержит консервативный повторяющийся мотив из трех аминокислотных остатков: (+, X1, X2, +, X1, X2...).*

Мутационный и электрофизиологический анализы позволили определить остатки, наиболее значимые (HI – high-impact) и менее значимые (LI – low-impact) для процесса активации/деактивации канала [59]. Сенсор потенциала S4 содержит консервативную последовательность (+, X1, X2, +, X1, X2...), в которой (+) – положительно заряженный HI (значимый) остаток, (X1) – гидрофобный остаток HI и (X2) – гидрофобный LI (незначимый) остаток (рис. 3А) [60, 61]. Остатки X1 располагаются в белковом окружении, где их мутации могут привести к нарушению упаковки белка, а следовательно, и к нарушению процесса открытия/закрытия канала. Остатки X2 экспонированы в липидное или водное окружение и их воздействие на функционирование канала незначительно. Повтор (+, X1, X2, +, X1, X2...) формирует три параллельных левозакрученных витка с небольшим наклоном вдоль правозакрученной спирали S4.

(2) *Каждая субъединица несет ~три воротных заряда, расположенных на остатках R1–R4 спирали S4.*

Движение сенсора потенциала S4 может быть детектировано посредством измерения воротных токов, происходящих при передвижении электростатических зарядов спирали S4 относительно электрического поля. При переходе канала *Shaker* из покоящегося в активированное состояние перемещается ~3.2–3.4 заряда на субъединицу [62–64]. Метод по-

очередной нейтрализации отрицательных зарядов спиралей S2/S3 и положительных зарядов S4 позволил идентифицировать аминокислотные остатки, переносящие воротный заряд [63, 64], – это R1, R2, R3 и R4 [65, 66].

(3) *10 аминокислотных остатков сегмента S4 расположены в мембране.*

Замена некоторых аминокислотных остатков канала *Shaker* на Cys показала, что при нахождении канала в состоянии покоя последовательность из ~10 а.о. недоступна как для внутриклеточного, так и для внеклеточного раствора [67, 68]. Эта последовательность соответствует ~13.5 Å α-спирали и может включать в себя только два или три положительных заряда S4 (рис. 3Б,В). Соответственно с обеих сторон мембраны имеются глубокие водные вестибюли, и лишь малая часть S4 располагается в коротком ВК (воротный канал) (рис. 3Б,В).

(4) *Спираль S4 может перемещаться в заполненной водой щели, так называемом «воротном канале» (ВК), с очень узким барьером между внешним и внутренним растворами.*

При этом три «стороны» ВК формируют спирали S2/S3, поровый домен и липиды. Взаимодействие между тремя консервативными отрицательными аминокислотными остатками в спиральях S2, S3 и положительными остатками в S4 свидетельствует о том, что S2 и S3 лежат с одной стороны ВК [63, 69–71].

Согласно данным флуоресцентного и мутационного анализа, с другой стороны ВК находится поровый домен [72, 73]. Это подтверждается тем, что при активации остатки R1 и R2 спирали S4 сближаются с E418 порового домена [74, 75], а Cys, введенные в S4, могут образовывать связь с Cys, введенными в поровый домен [45, 59].

Третья сторона ВК, по-видимому, образована липидами, что соответствует гидрофобной природе остатка спирали S4 в позиции X2. На это также указывает слабая связь мутаций этих остатков с активацией канала [60, 61].

(5) *Активация приводит к смещению сегмента S4 на девять аминокислотных остатков.*

Методом измерения флуоресценции показано, что процесс активации связан с передвижением ~9 а.о. S4 из ВК во внешний раствор [61, 67, 68, 76, 77]. При этом последовательность из ~9 а.о. исчезает из внутреннего водного вестибюля [67, 68].

(6) *Спираль S4 вращается во время активации.*

С помощью метода FRET обнаружено, что при активации канала происходит вращение S4 на ~180° [78, 79].

(7) *Сенсор мембранного потенциала S4 имеет стабильное промежуточное состояние.*

С помощью кинетических исследований обнаружены две фазы движения воротных зарядов [80] и два последовательных передвижения воротных зарядов во внешнем направлении с промежуточной трансмембранной позицией S4 [68].

(8) Канал может формировать протонную пору.

Замена остатка R1 либо R4 на His позволяет каналу пропускать протоны (омега-ток) [65, 66]. Следовательно, канал может содержать водный канал, который служит мостом между внутренним и внешним растворами, при этом R1H формирует протонную пору в состоянии покоя, R4H в активированном состоянии.

ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЕ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

На основе представленных выше ключевых фактов была предложена (1) модель вращающихся спиралей (ВСМ) [59]. Поровый домен в модели Kv-канала создан на основе структуры гомологичного калиевого канала KcsA, расположение же спиралей VSD в это время оставалось неизвестным. Модель ВСМ подробно описывает лишь взаимное расположение некоторых аминокислотных остатков спиралей S1–S4. Согласно этой модели, сравнительно короткий (~13.5 Å) канал ВК имеет большие вестибулы, заполненные водой как с внешней, так и с внутренней стороны. Благодаря этому пространству электрическое поле фокусируется на небольшом участке S4, что, в свою очередь, минимизирует контакт нескольких заряженных аминокислот с диэлектрическим окружением и дает большой воротный заряд. При активации происходит винтовое передвижение S4 перпендикулярно поверхности мембраны тремя отдельными этапами. Винтовое движение во время активации может останавливаться в стабильных

промежуточных положениях, в которых основные заряды (R1–R4) передвигаются в положение, занятое предыдущим зарядом (рис. 4А). При этом положительно заряженные остатки R1–R4 формируют последовательные ионные пары с отрицательно заряженными аминокислотными остатками соседних спиралей. На каждом этапе происходит перенос 1/3 общего заряда (~3) на субъединицу, т.е. в целом одного заряда (рис. 4) [59].

После расшифровки кристаллической структуры бактериального канала KvAP [43, 81] появилась совершенно другая модель активации – (2) лопастная модель (ЛМ).

В кристаллической структуре канала KvAP спираль S3–S4 расположены около внутриклеточной поверхности мембраны, перпендикулярно оси поры (рис. 4Б). Было показано, что спираль S3 состоит из двух фрагментов (S3a и S3b), соединенных петлей S3 (рис. 3Б). Сегмент S3b и N-концевая часть спирали S4 уложены антипараллельно строго друг против друга, образуя почти полностью гидрофобный элемент со структурой спираль–петля–спираль, который прикреплен к поровому домену через гибкую петлю спирали S3 и линкер S4–S5 (рис. 3Б). Этот элемент (S3b–S4) назвали «лопастью» [43], в связи с чем модель получила свое название.

Согласно ЛМ, в закрытой конформации положительно заряженные лопасти канала находятся около внутриклеточной поверхности мембраны и удерживаются в таком положении большим электрическим полем при отрицательном потенциале покоя мембраны. В ответ на деполяризацию лопасти как единое целое движутся через мембрану к наружной стороне, в результате чего тянут за собой линкер S4–S5, увлекаящий за собой спираль S5 в сторону от оси поры.

Эта модель согласуется с некоторыми экспери-

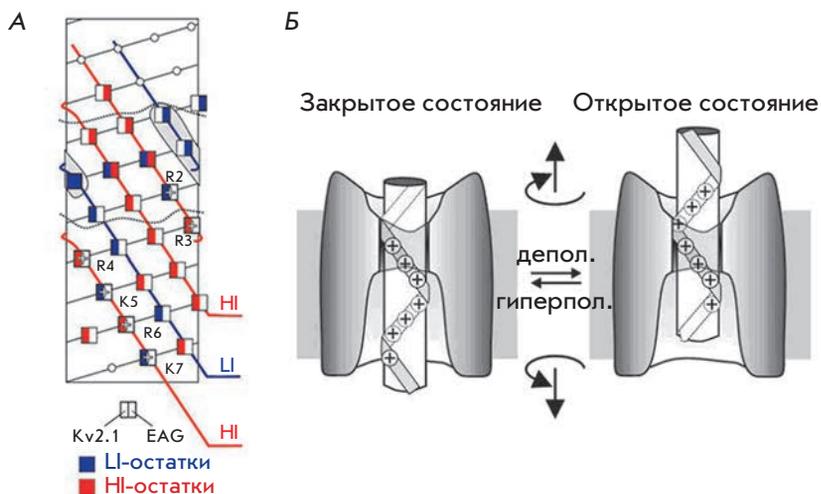


Рис. 4. А – схема расположения остатков спирали S4 каналов Kv10 и Kv2. 1. Показано расположение важных (HI) и неважных (LI) для открытия/закрытия остатков. Три параллельных полосы вдоль спирали S4 (HI заряженные остатки, HI гидрофобные остатки, LI гидрофобные остатки) непрерывны у обоих каналов и формируют три шага винта [59]. Б – схема активации Kv-канала согласно модели ВСМ [59]: винтовое вращение и движение спирали S4 (белый цилиндр) в неподвижном (ВК) канале

ментальными данными [46, 81], которые указывают на возможность движения лопасти сенсора потенциала на большое расстояние (порядка 20 Å). Однако более поздние эксперименты показали, что использованная кристаллическая структура KvAP [43] находится в ненативной конформации [82].

После получения новых структурных данных [65, 67–69, 71, 73, 83–86] была сформулирована (3) *усовершенствованная ВСМ* [87], созданная на основе данных о последовательности канала *Shaker* и кристаллической структуре канала KvAP [43]. Как и в предыдущей модели [59, 88], новая модель предполагала, что движение между открытой и закрытой конформациями канала включает три последовательных винтовых движения, при котором S4 передвигается на ~13.5 Å вдоль оси и вращается на 180°. При этом положительно заряженные группы S4 остаются в полярном окружении, где они могут взаимодействовать с отрицательно заряженными остатками спиралей S1–S3, с другими полярными атомами, отрицательно заряженными головками липидов и водой. В модели имеется единственный барьер, разделяющий аминокислотные остатки S4 на доступные снаружи и изнутри (рис. 4Б). Эта модель более подробно описывает взаимодействие различных аминокислот домена VSD между собой и включает в себя моделирование поровой части канала.

Более поздние данные по FRET [78] и потенциометрическим исследованиям [89] показали, что S4 практически не перемещается в трансмембранном направлении [48], что противоречит ВСМ и особенно ЛМ. Кроме того, в открытом состоянии верхняя часть сенсора S4 взаимодействует с поровым доменом, что невозможно в ЛМ. Эти данные, а также более ранние исследования [45, 84, 89, 90] привели к возникновению (4) *транспортной модели активации* (ТМА) [48, 84, 91] (рис. 5А,Б).

Согласно модели ТМА, как и ВСМ, в канале существуют глубокие водные полости с обеих сторон мембраны, разделенные небольшим участком канала посередине мембраны; именно в этой точке фокусируется электрическое поле, и для переноса воротных зарядов с одной стороны мембраны на другую не нужно больших движений S4. Во время активации канал S4 меняет свое положение, наклоняясь на 45°, но при этом передвигается перпендикулярно поверхности мембраны на незначительное расстояние (менее 2 Å), в то время как Arg на этой спирали перемещаются из глубокой водной полости с внутренней стороны в полость с внешней стороны мембраны. Такое перемещение Arg возможно благодаря двум барьерам, которые контролируют доступность аминокислотных остатков S4 для воды с внутренней и внешней стороны (рис. 5). При этом

движение спирали S4 сочетает в себе вращение и наклон, и она всегда находится в полярном окружении (рис. 5А,Б). В модели ТМА спираль S4 может быть качественно сравнена с транспортером, у которого в каждом цикле доступность сайта связывания меняется между внутренней и наружной сторонами. Такой эволюционно консервативный механизм достаточен для переноса большого количества зарядов через электрическое поле без передвижения S4 через мембрану. Модель ТМА согласуется со многими экспериментальными данными [47, 60, 72, 73, 78, 89, 93].

Наибольшая разница между основополагающими моделями заключается в амплитуде движения сегмента S4, что может быть следствием принятых в моделях упрощений. Например, в модели ВСМ движение S4 в основном представляется как движение жесткого тела, однако было показано, что S4 может переходить из конформации α -спирали в спираль 3_{10} [44, 54, 94–97]. В модели ЛМ предполагается, что лопасть S3–S4 движется как одно целое, но экспериментально показано, что эти две спирали передвигаются независимо [98].

СОВРЕМЕННЫЕ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

С установлением кристаллической структуры эукариотического канала Kv1.2 (рис. 2Б) [21], которая впоследствии была улучшена [99], и структуры химеры Kv1.2/Kv2.1 [44] доступными стали новые данные об открытой конформации Kv-канала. Усовершенствование компьютерной техники и методов дало возможность рассчитывать более сложные молекулярные модели и изучать механизмы функционирования посредством молекулярной динамики. Все это привело к появлению ряда новых моделей и гипотез активации Kv-каналов, в частности, (5) *модели согласованного движения спиралей* (СДС) [53].

На основе данных рентгеноструктурного анализа (рис. 2Б) [53] была построена молекулярная модель эукариотического канала Kv2.1 в закрытом состоянии и создана СДС-модель активации канала. С этой целью использовали моделирование *de novo* (метод Rosetta), метод молекулярной динамики (МД) и данные флуориметрии с фиксацией напряжения (voltage-clamp fluorimetry, VCF).

Согласно модели СДС, во время деполяризации мембраны S4 движется как наклоняющийся винт, вращаясь на ~180° по часовой стрелке (с внеклеточной стороны), поднимаясь вертикально на 6–8 Å и меняя угол наклона с ~60° до ~35°. Амплитуда вертикальных движений S4 варьирует от ~0 Å для S308 до ~14 Å для S289. При этом спирали S1, S2, S3 вращаются вокруг S4 по часовой стрелке, что согласуется с ранними данными [49] (рис. 6).

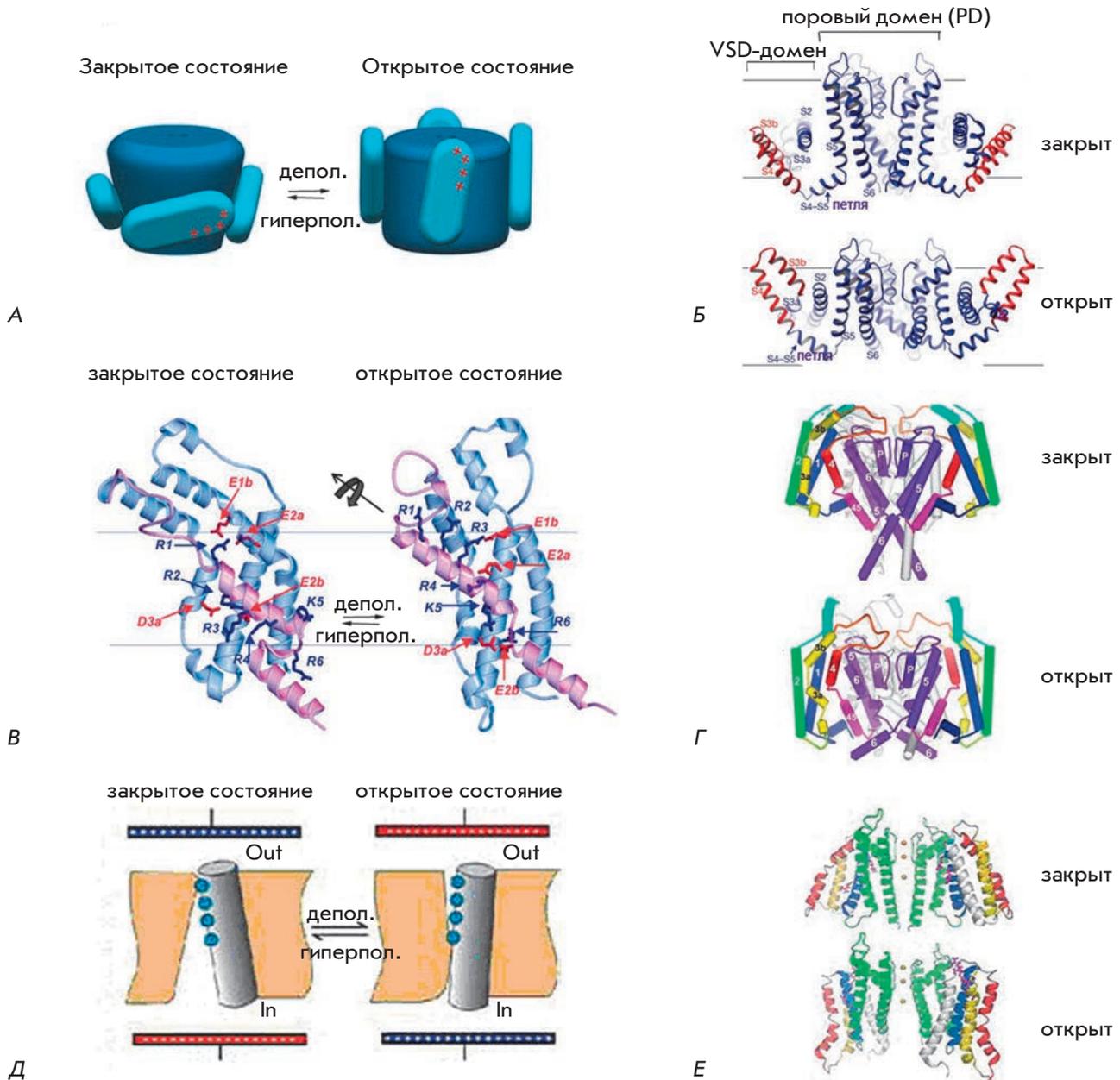


Рис. 5. Различные модели активации Кv-каналов. Все каналы и их части представлены в боковой ориентации: сверху – внеклеточное пространство, внизу – цитоплазма. **А** – схема лопастной модели (ЛМ) активации Кv. Показано движение лопастей (овалы голубого цвета). Красными плюсами обозначены Arg в спирали S4. **Б** – модель ЛМ, основанная на кристаллической структуре КvAP [92]: показаны закрытая и открытая конформации. Лопасть S3b–S4 изображена красным цветом. Спирали S1–S4 подписаны. Канал показан во фронтальном разрезе. **В** – ВСМ. Показаны изменения в VSD-доме́не канала *Shaker*. Подвижные сегменты S4 и петля S4–S5 отмечены фиолетовым цветом. Положительно заряженные боковые цепи спирали S4 и отрицательно заряженные боковые цепи спиралей S1–S3, взаимодействующие друг с другом, отмечены соответственно синим и красным [83]. **Г** – ВСМ. Показаны полноразмерные каналы в закрытой и открытой конформациях. Спирали S1–S6 пронумерованы. Спирали домена VSD раскрашены в разные цвета. Спирали порового домена (S5–S6) отмечены фиолетовым цветом [83]. **Д** – схема движения спирали S4 (серый цилиндр) во время активации Кv-канала согласно ТМ, показывающая как деполяризация меняет доступность остатков Arg (синие кружки) из внутренней и наружной водной полости [48]. **Е** – ТМ-активации Кv-каналов: показаны закрытая и открытая конформации канала *Shaker*. Трансмембранные спирали обозначены цветом: S1 – белым, S2 – желтым, S3 – красным, S4 – синим; поровый домен обозначен зеленым; Arg в S4 фиолетовый [48]

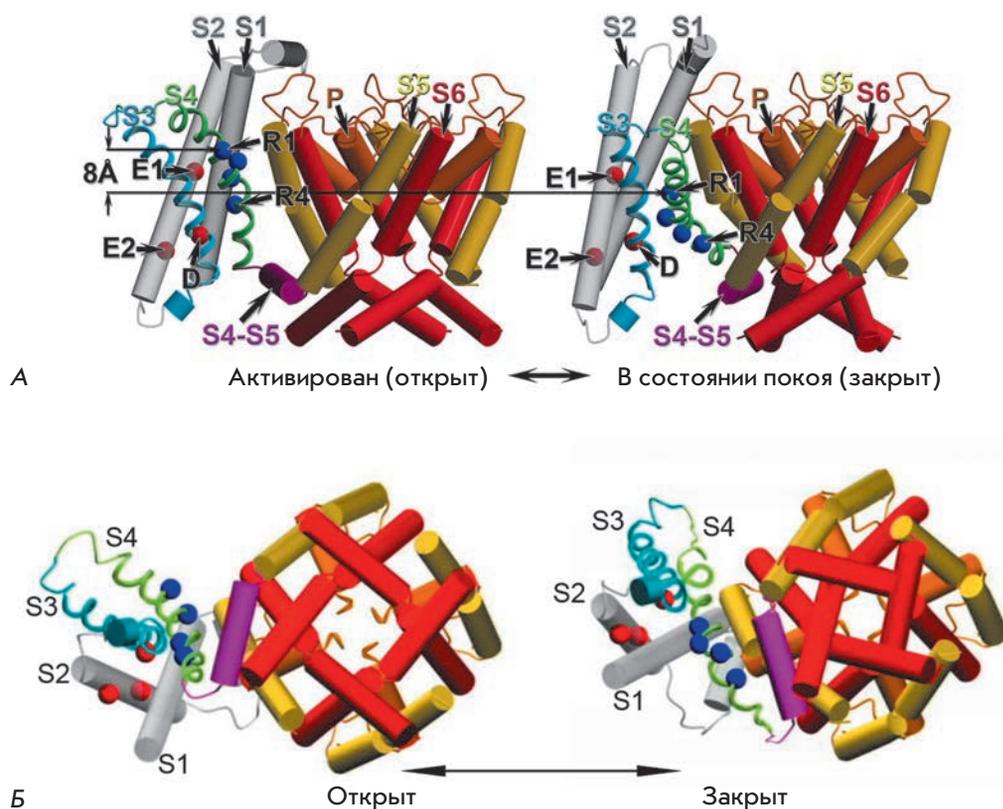


Рис. 6. Модель СДС. Сравнение моделей канала Kv1.2 [53] в активированном (открытом) состоянии (слева) и в состоянии покоя (закрытом) (справа). Все спирали изображены цилиндрами, кроме S3 и S4, которые показаны спиралями. Показан только один VSD-домен. Спирали S1 и S2 – серые, линкер S4–S5 – малиновый. Положение углеродных атомов C α Arg спиралей S4 обозначено R1 и R4 и выделено голубым. Аминокислотный остаток E226 спирали S2 подписан E1, E236 спирали S2 – E2, D259 спирали S3 – D; эти аминокислоты выделены красным. А – вид сбоку. Б – вид со стороны внеклеточного пространства

Исходя из результатов измерения омега-тока [100] определили, что в закрытом состоянии канала между R1 в спирали S4 (R294 в Kv1.2) и E226 (в Kv2.1) в спирали S2 формируется солевой мостик (рис. 6А), который стабилизирует закрытое состояние и препятствует проникновению ионов из внеклеточного водного вестигуля во внутренний [53]. При замене R1 на маленькую неполярную аминокислоту солевой мостик разрушается и образуется сквозная пора, пропускающая протоны, возникает омега-ток [100], что подтверждено электрофизиологическими экспериментами [101, 102].

Полученные данные свидетельствуют о том, что активация Kv-каналов связана с двумя основными типами конформационных изменений: (1) независимые движения VSD-доменов с переходом из состояния покоя в «закрытое активированное» состояние, которое сохраняет ворота порового домена закрытыми [103–105], и (2) кооперативный переход всех доменов VSD и порового домена в открытое состояние, при котором ворота порового домена открыты для проникновения ионов [104–106].

В модели СДС роль открытия ворот отводится внутриклеточному участку спирали S6, при этом S5 сначала поворачивается на ~ 7 Å вокруг порового домена. Таким образом, во вторую основную перестройку вовлечены наклоны спирали S4, способствующие наклону внутриклеточной половины спирали S5. Такое

движение против часовой стрелки (с внеклеточной стороны мембраны) дает возможность линкеру S4–S5 и спирали S6 во всех четырех субъединицах двигаться вместе и открывать внутриклеточные ворота (рис. 6).

Модели СДС закрытого и открытого канала показывают следующие молекулярные детали механизма активации Kv-канала (рис. 6):

(1) Спираль S4 движется вертикально на ~ 6 –8 Å. В ранее опубликованных структурных моделях трансмембранного участка домена VSD в открытом и/или закрытом состоянии величина вертикальных движений S4 значительно различается: ~ 2 –4 [48], ~ 3 [49] и 10–13 Å [87, 100]. Опубликованная ранее модель канала KvAP в состоянии покоя [46, 81] говорит о вертикальных движениях S4 с амплитудой ~ 15 –20 Å;

(2) Спираль S3 движется относительно спиралей S1, S2 и S4. В предыдущих публикациях не отмечено заметных движений спирали S3 относительно всех других сегментов VSD-домена;

(3) Согласованные движения спиралей S4, S5, линкера S4–S5, S6 во всех четырех субъединицах при финальном открытии канала. Ни в одной из ранее опубликованных моделей активации не был показан механизм кооперативных движений при открытии канала.

Соответствие модели СДС широкому кругу данных, которые ранее считались противоположными

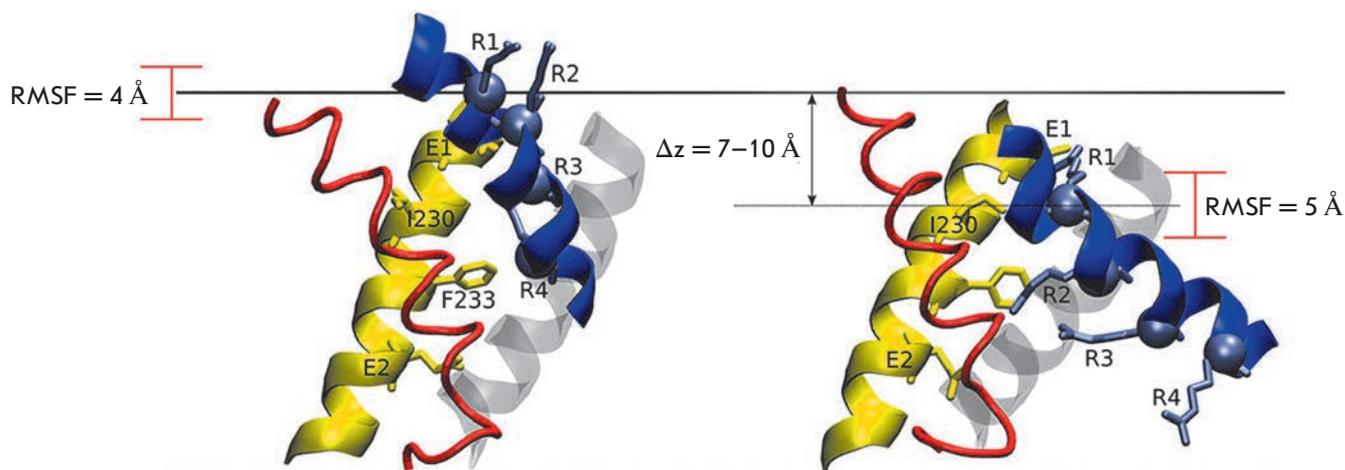


Рис. 7. Модель КМ. Сравнение моделей домена VSD-канала Kv1.2 в открытом (слева) [21] и закрытом (справа) состоянии канала (модель КМ). Спираль S1 показана серым цветом, S2 – желтым, S3 – красным, S4 – синим. Атомы C α остатка R294 перемещаются вертикально на 7–10 Å. Значения среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) отражают разброс вертикальных координат z, рассчитанных для атома C α . Синими шариками с боковыми радикалами обозначены основные заряженные аминокислотные остатки спирали S4 (R1–R4), которые взаимодействуют с аминокислотными остатками других спиралей (подписаны и показаны их боковые цепи) [55]

[47, 60, 72, 73, 93, 100, 107], позволяет устранить многие противоречия в обсуждении конформационных перестроек, лежащих в основе активации Kv-каналов. Как и в модели ВСМ [108], главное движение в модели СДС – осевое вращение S4 на $\sim 180^\circ$. Как в ТМА [48], диэлектрическая полость вносит вклад в концентрирование трансмембранного поля, увеличивая таким образом воротный заряд, который энергетически связывает домен VSD с мембранным потенциалом.

Позднее модель СДС была улучшена методом полноатомной молекулярной динамики в мембранном окружении с явным растворителем [55, 109]. Было показано, что в закрытом состоянии канала Kv1.2 α -спираль S4 спонтанно переходит в правозакрученную спираль 3_{10} . Такая конформация спирали S4 ориентирует Arg к водной полости в домене VSD и позволяет образовывать солевые мостики с отрицательно заряженными аминокислотными остатками вдоль спиралей S2 и S3. Стремление сегмента S4 принять конформацию спирали 3_{10} согласуется с кристаллическими структурами каналов [44, 94], в которых внутренняя часть S4 (~ 11 а.о.) образует спираль 3_{10} .

Опираясь на улучшенную модель СДС [54], Варгас и соавт. [55] создали (6) консенсусную модель (КМ). Они использовали данные об основных взаимодействиях между аминокислотными остатками спиралей VSD-домена в закрытом канале. С использованием метода МД были смоделированы четыре ключевых взаимодействия (R294 и I177; R294 и I230; I230 и F267;

F233 и R294 в канале Kv1.2). При этом получили четыре независимые модели, которые в дальнейшем усреднили для создания КМ закрытой конформации канала Kv1.2 (рис. 7).

Модель КМ согласуется со всеми экспериментальными результатами, на которых были основаны ранние модели (ВСМ, ТМА, ЛМ) [46, 84, 89, 110–113]. КМ показывает, что S4 движется в вертикальном направлении примерно на 7–10 Å (рис. 7) [55].

Однако модели СДС и КМ не в состоянии объяснить все аспекты открытия/закрытия канала. Одна из причин этого – отсутствие знаний о структуре промежуточных конформаций Kv-канала. В связи с этим были предприняты попытки определить количество промежуточных конформаций и их строение экспериментальными методами и ММ.

МакКиннон и соотр. [114] обнаружили в домене VSD высококонсервативный сайт (рис. 8A), сформированный двумя отрицательно заряженными аминокислотными остатками (D259, E236 – в канале *Shaker*) и одним высококонсервативным (F233), который представляет собой «катализатор» переноса через мембранное поле каждой из основных аминокислот (R1–R4, K5) VSD-домена.

Этот сайт был назван центром переноса зарядов (ЦПЗ) [114]. При движении S4 каждый из ее заряженных остатков последовательно связывается с этим центром, в результате чего весь процесс активации/инактивации разделяется на пять последовательных стадий (открытый канал, три про-

Kvchim CIIWFSF*EFLVRFACPSKAG---FFTNIMNII*DIVAI
 Shaker CIIWFTF*ELTVRFLACPKNLN---FCRDVMNVIDIIAI
 Nav1.1 FTGIFTA*EMFLKIIAMPYY----YFQEGWNIFDGFIV
 Cav1.1 FLIVFSI*EAAMKIIAYGFLFHQDAYLRSGWNVLDFTIV
 Hv1 ILVFFMME*IIFKLFVF--RLE---FFHHKFEILD*AVVV
 VSP LSCYF*MLDLGLRIFAYGPKN----FFTNPWEVADGLII

А

Б

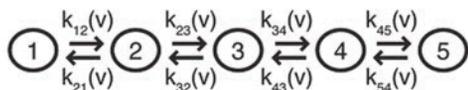


Рис. 8. А – сайт центра переноса зарядов (ЦПЗ), высококонсервативный в белках, содержащих VSD. Показаны выровненные последовательности химерного канала Kv1.2/2.1 (GI: 160877792), *Shaker* (GI: 13432103), человеческого канала Nav1.1 (GI: 115583677), человеческого канала Cav1.1 (GI: 110349767), человеческого канала Hv1 (GI: 91992155) и VSP (GI: 76253898). Представлены только те участки сегментов S2 и S3, которые формируют ЦПЗ. Высококонсервативные остатки, формирующие сайт, выделены: F – зеленым; E и D – красным. F соответствует Phe233 в химерном канале Kv1.2/2.1. Б – модель активации Kv-канала, состоящая из пяти стадий, на которых происходят четыре этапа передвижения VSD. На каждой стадии разные положительно заряженные остатки спирали S4 ((R1–R5) отмечены номерами) последовательно занимают ЦПЗ (показан окружностью). Когда все четыре сенсора приходят к пятой стадии, пора открывается [114]

межуточных стадии и закрытый канал), в которых заряженные аминокислоты спирали S4 (R1–R4, K5) последовательно связываются с ЦПЗ (рис. 8Б). Используя метод МД и данные исследования, группа французских ученых [115] изучила структуру домена VSD в различных промежуточных состояниях канала Kv1.2, помещенного в липидный бислой с приложенным гиперполяризационным потенциалом. Эти пять стадий (состояний) были названы: начальное верхнее положение, α ; три промежуточных, β , γ , δ ; нижнее закрытое положение, ϵ (рис. 9). При деактивации канала основные заряженные аминокислотные остатки S4 движутся от внешних к внутренним сайтам связывания, которые представляют собой отрицательно заряженные остатки сегментов S1–S3 (E183, E226, D259 и E236), а также группы PO_4^- липидов. Во время деактивации канала центр масс остатков R1–R4 движется во внутриклеточном направлении приблизительно на 12 Å [78, 79]. Кроме того, каждое из четырех перемещений сопровождается передвижением одного остатка (K5, R4, R3 и R2) че-

рез участок ЦПЗ (рис. 9). В результате была предложена (7) модель перемещения зарядов (МПЗ).

При рассмотрении процесса с внешней стороны мембраны движение S4 сопровождается слабым наклоном ($\sim 15^\circ$); в стадии ϵ S4 становится под большим наклоном к мембране по сравнению со стадией α . Как показано в более ранних экспериментах [78, 79], происходит умеренное спиральное вращение S4 по часовой стрелке ($\sim 45^\circ$) и значительное спиральное скручивание против часовой стрелки ($\sim 90^\circ$) (рис. 9). В этой модели отсутствует значительное по сравнению с другими моделями перемещение спирали S4, пока не повернется ее верх [50, 53, 96]. Данная модель учитывает данные о наличии ЦПЗ [114]: сайт ЦПЗ связывает основные остатки K5, R4, R3, R2 и R1 в конформациях α , β , γ , δ и ϵ соответственно. В каждой конформации позиция ЦПЗ сохраняется в пределах центральной части липидного бислоя [115].

Опираясь на результаты экспериментов по созданию металл-ионных (Cd^{2+}) мостиков, позднее обнаружили 20 новых сайтов взаимодействия между спиралями VSD-домена [116]. Эти данные использовали для моделирования (методом Rosetta) различных промежуточных конформаций канала *Shaker* и создания (8) модели деактивации Kv-каналов (МДК) [116]. Согласно модели МДК, при деактивации канал проходит пять стадий: О – открытый канал, С1–С2 – промежуточные состояния, С3 – закрытая конформация, С4 – глубокое закрытое состояние, возникающее при сильной гиперполяризации (рис. 10). Стадия С3 соответствует КМ закрытого состояния Kv-канала [55].

В модели МДК во время деактивации S4 быстро движется во внутриклеточном направлении, по крайней мере на 12 Å, скользя вдоль спирали S3 (рис. 10) [116]. При этом короткий участок спирали S4 (~ 10 а.о.) имеет конформацию 3_{10} -спирали. На стадии открытого канала (О) 3_{10} -спираль располагается посередине S4, при движении S4 вниз 3_{10} -спираль перемещается по сегменту S4, оставаясь все время в центре мембраны. При этом 3_{10} -участок с обеих сторон ограничивается двумя из пяти заряженных аминокислот (R1–R4, K5), а центральная его часть располагается напротив ЦПЗ (F290). На стадии С4 участок 3_{10} полностью переходит в α -спираль. Arg, расположенный выше F290, формирует солевой мостик с E283, а Arg, находящийся ниже, – мостик с E293 (и E283 и E293 располагаются в спирали S2) (рис. 10). Деформация, вызванная этими солевыми мостиками, является основным стабилизирующим фактором 3_{10} -спирали. На стадии С4 последний остаток R1 проходит ниже гидрофобного замка, сформированного F290, и не может сформировать солевой мостик с E283, в результате чего структура S4 релаксирует в α -спираль. Стадия С4 труднодостижи-

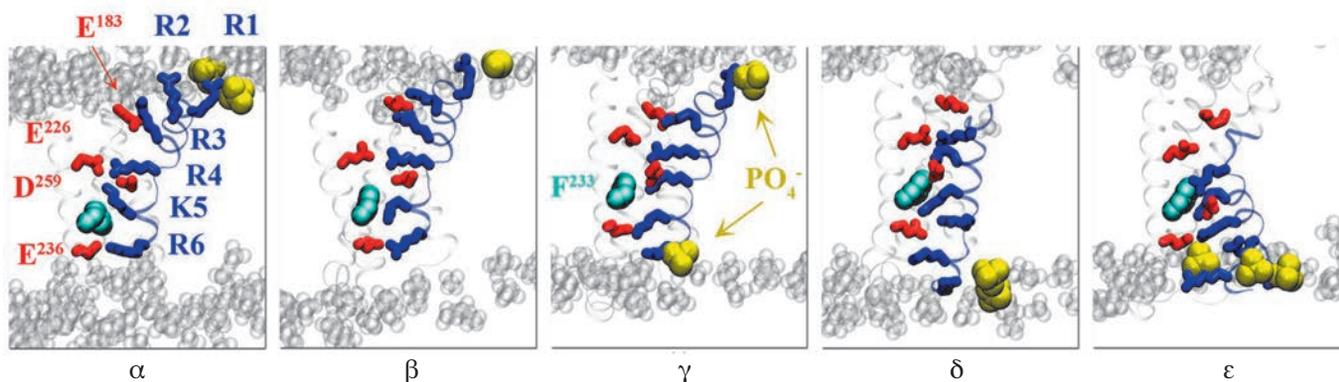


Рис. 9. Пять ключевых промежуточных стадий домена VSD канала Kv1.2 согласно модели МПЗ: начальное верхнее положение, α ; три промежуточных, β , γ , δ ; и нижнее закрытое положение, ε . Основные остатки спирали S4 показаны синими палочками, аминокислотные остатки и PO_4^- -группа липидов, с которыми R1–R5 образуют солевые мостики, подписаны и обозначены красными палочками и желтыми шариками соответственно. Высококонсервативный остаток F233 спирали S2 показан голубыми шариками [115]

ма и возможна только при значительной гиперполяризации [117]. Для достижения стадии C4 сегмент S4 должен передвинуться на 17 Å [116]. Существование C4 подтверждается экспериментальными данными [114, 118].

ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОРОВЫМ И VSD-ДОМЕНАМИ

До сих пор невыясненным остается вопрос, как движение VSD приводит к открытию поры канала, т.е. как осуществляется электромеханическая связь между VSD- и поровым доменами. Известно, что основная роль в этом процессе отводится линкеру S4–S5 [31, 56], но структурные данные отсутствуют. Для объяснения функционирования Kv-канала и выяснения механизма электромеханической связи порового и VSD-доменов группа исследователей [56] изучила кристаллическую структуру открытого состояния канала Kv1.2/Kv2.1 [44, 119] с помощью метода МД.

Была создана цельная и подробная (9) *механистическая модель активации/деактивации Kv-канала (ММД)* (рис. 11), объясняющая многие ранее неизвестные черты этого процесса [56].

При деактивации канала происходит уменьшение ионного транспорта, сопровождаемое выходом воды из гидрофобной полости поры и конкурентным закрытием поры (коллапс поры), что объясняет осмотическую зависимость всего процесса функционирования канала [17, 18]. Далее происходит (1) полная релаксация доменов VSD – передвижение S4 внутрь на ~15 Å относительно более неподвижных спиралей S1–S3a, а также (2) вращение S4 на ~120°, благодаря которому заряженные аминокислотные остатки остаются направленными в полость VSD,

и (3) боковое разделение VSD и порового доменов за счет вращения и передвижения VSD наружу относительно поры, что позволяет поре оставаться закрытой. Остаток R4 при активированном состоянии канала располагается по центру мембраны в точке наибольшего трансмембранного электрического поля и является инициатором движения воротных зарядов. ЦПЗ – центральный гидрофобный остаток F233, разделяющий внешнюю и внутреннюю гидратированные полости домена VSD. Остатки R3 и R2 движутся последовательно, при этом движение S4 во внутреннем направлении обычно останавливается, когда R1(Q) достигает F233. В VSD-доме образуются несколько солевых мостиков, но в основном S4 взаимодействует с фосфатными группами липидов. Эти данные согласуются с данными о функциональном взаимодействии VSD-домена с липидами [13, 120].

При активации канал проходит те же этапы, но в обратном направлении (рис. 11): S4 стремительно передвигается наружу на ~5–10 Å. На первом этапе воротные заряды передвигаются быстро, так как большинство солевых мостиков между S4 и другими сегментами домена VSD в закрытом состоянии разрушены; при движении S4 наружу эти солевые мостики временно восстанавливаются, приводя к постепенному замедлению движения S4. Как только движение S4 подходит к завершению, домены VSD приближаются к состоянию, характерному для активированного канала. Ключевое отличие от деактивации состоит в том, что все четыре домена VSD должны быть подняты перед полным открытием поры канала; канал с полностью перемещенными вверх сегментами S4 нарушает упаковку линкера S4–S5 со спиралью S6, что позволяет воде и выходящим ионам вновь зайти в пору и восстано-

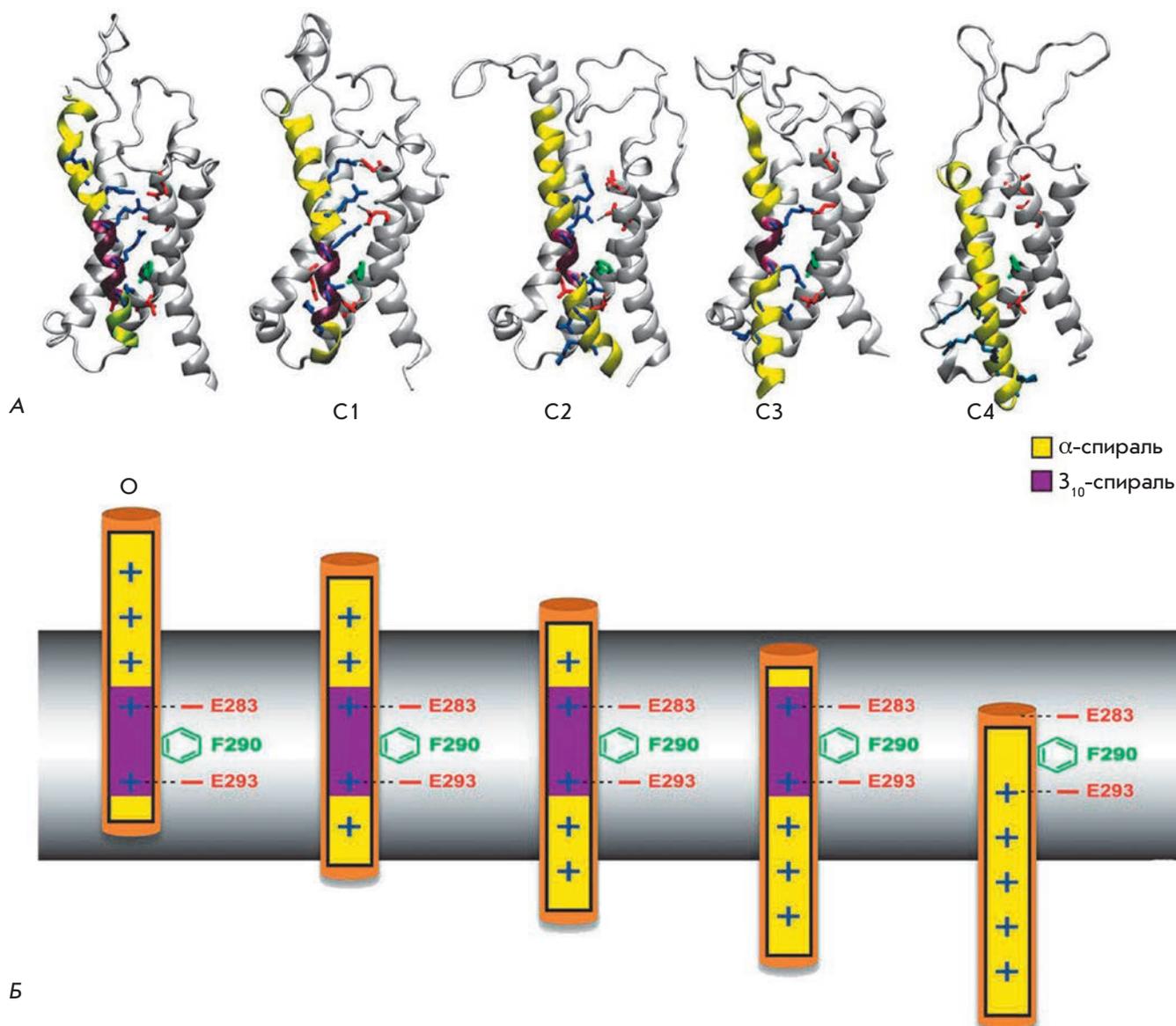


Рис. 10. Модель МДК. Промежуточные стадии, которые проходит VSD-домен канала *Shaker* при деактивации [116]. А – молекулярные модели домена VSD: О – открытый канал, С1–С2 – промежуточные состояния, С3 – закрытая конформация, С4 – глубокое закрытое состояние, возникающее при особых условиях. На каждой стадии боковая цепь одного из Arg спирали S4 (голубые палочки) проходит через ЦПЗ (F290, зеленая палочка), при этом боковые цепи Arg, оказавшиеся рядом с ЦПЗ, формируют солевые мостики с отрицательно заряженными остатками спиралей S1–S3 (красные палочки; E247 в S1 и E283 в S2 выше F290, и E293 в S2 и 316D в S3 ниже F290). На всех стадиях участок спирали S4, располагающийся напротив F290, переходит в 3_{10} -спираль (фиолетовая), однако на стадии С4 этот участок релаксирует в α -спираль (желтая). Таким образом, участок 3_{10} -спирали скользит вдоль сегмента S4 без затрат энергии, что предотвращает вращение этого участка во время активации/деактивации канала. Б – схема, показывающая движения спирали S4. Цвета как на рис. 10А

вить проводимость. Боковые цепи L331 (S5) и P405 (S6) переходят в положение, позволяющее им взаимодействовать [17]. Такие перестройки способствуют связыванию спирали S6 с мотивом PVP, что приводит к расширению с внутриклеточной стороны и полной гидратации поры. Сопутствующее этому откры-

тие верхних (гидрофобных) ворот (I402) позволяет сайту S5 селективного фильтра заполниться ионами K^+ [121], а каналу перейти в полностью открытое состояние. Спираль S6 и линкер S4–S5 принимают плотноупакованную конфигурацию, которая стабилизирует открытие поры.

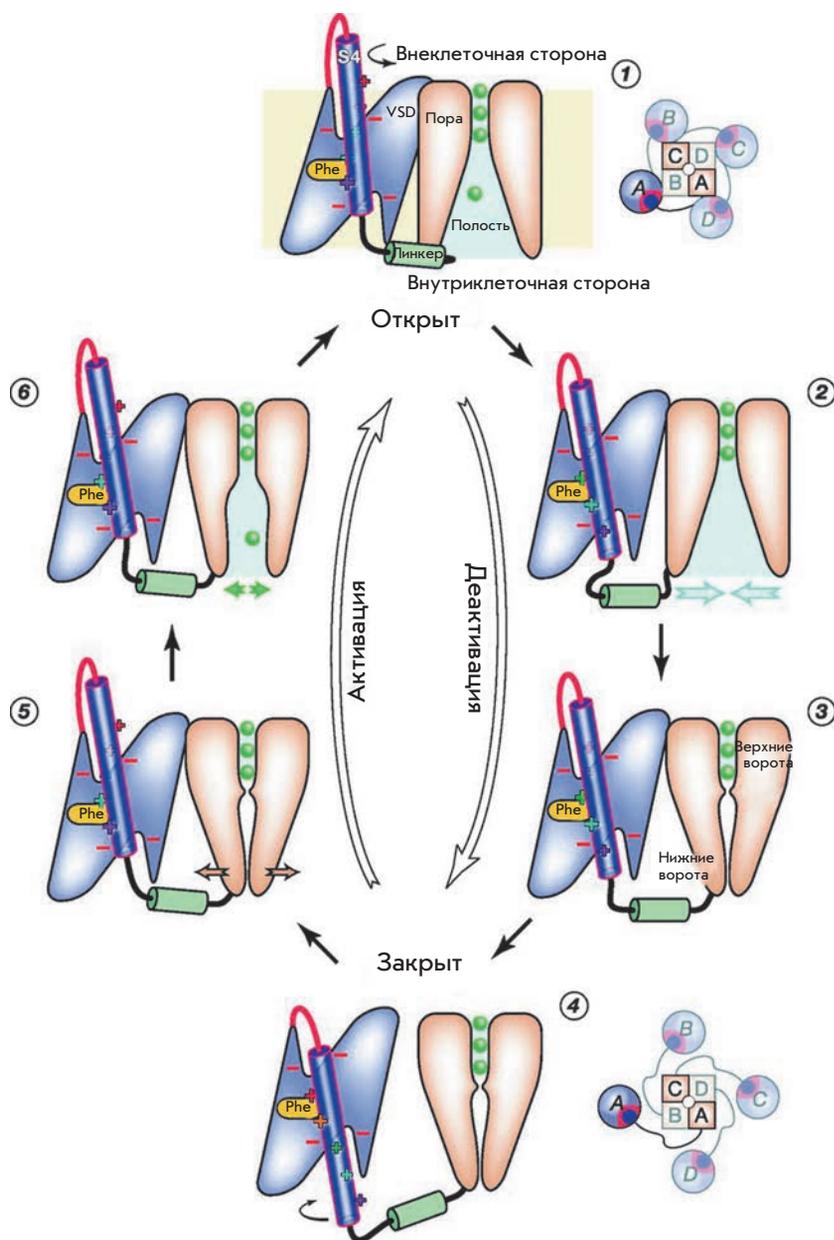


Рис. 11. ММд-модель активации К_v-канала [56]. Воздействие на канал в активированном состоянии (1) потенциала гиперполяризации инициирует движение спирали S4 во внутреннем направлении и ослабление связи между VSD- и поровым доменами. В результате происходит истощение ионного транспорта в полости поры (2) и дальнейший ее гидрофобный коллапс. Закрытие верхних (Ile402 в K_v1.2) и нижних ворот [PVP мотив; Leu331 (S5)–Pro405 (S6)] останавливает ток ионов (3). S4 продолжает движение во внутреннем направлении; как только S4 заканчивает движение, линкер S4–S5 полностью опускается, и домены VSD отстраняются от поры – канал переходит в закрытое состояние (4). Воздействие потенциала деполяризации на канал в закрытом состоянии приводит к движению спирали S4 во внешнем направлении. Когда все четыре сегмента S4 и линкера S4–S5 поднимутся (5) и все VSD-домены снова приблизятся к поро, тогда нижние ворота дестабилизируются; переход 4 => 5 – этап, лимитирующий скорость активации канала. Флуктуация нижних ворот вызывает открытие поры и частичную ее регидратацию, что позволяет ионам калия войти внутрь и инициировать проводимость канала (6); переход 5 => 6 не зависит от потенциала. Присутствие ионов способствует полной регидратации поры, что приводит к полному открытию верхних и нижних ворот, возвращая канал к открытому состоянию (1). Расположение доменов VSD (кружки) относительно порового домена (квадраты) показано схематически (вид с внеклеточной стороны) [56]

Мы приходим к выводу, что открытие и закрытие К_v-канала – это энергетически асимметричный процесс [56]. Поскольку пора более стабильна в дегидратированном закрытом состоянии [17, 122] (в связи с гидрофобностью полости поры [17]), для ее закрытия нет необходимости в сильном давлении спирали S4 на линкер S4–S5. Напротив, активация канала требует приложения работы деполяризации, стимулирующей передвижение спирали S4 через мембрану, которая в конечном счете сильно тянет линкер S4–S5, что приводит к нарушению взаимодействия S4–S5/S6 и открытию поры. Только когда все воротные заряженные аминокислотные остатки и линкер S4–S5 находятся в поднятом состоянии, происходит

достаточно сильная дестабилизация закрытой поры, в результате чего флуктуации нижних ворот (за счет нарушения взаимодействий линкера со спиралью S6) позволяют частично, а затем и полностью гидратировать полость поры. Линкер S4–S5 находится в напряжении в активированном состоянии канала и ослаблен в состоянии покоя, что, возможно, объясняет консервативность длины линкера: более короткий линкер ингибирует закрытие канала, так как S4 не может переместиться на достаточное расстояние, а более длинный линкер ингибирует открытие, потому что даже полное перемещение S4 во внешнем направлении не может эффективно тянуть спираль S6 посредством линкера S4–S5 [56].

Таким образом, модель ММд показала, что линкер S4–S5 и С-конец спирали S6 управляют процессом открытия/закрытия канала независимо от механизма, поднимающего и опускающего домен VSD [56]. Тот факт, что лопасть S3b–S4 можно заменить гомологичной последовательностью с сохранением химерным каналом свойств нативного канала [123, 124], свидетельствует о том, что эта лопасть является ключевым механистическим элементом в процессе активации/деактивации канала. Если учесть природную вариабельность последовательности данного функционального участка (лопасть S3b–S4 и взаимодействующий участок линкера S4–S5 со спиралью S6), то понятными становятся различия в параметрах активации Kv-каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе длительной истории изучения механизма активации Kv-каналов было предложено большое количество моделей, начиная с основополагающих (ВСМ, ЛМ и ТМА) и заканчивая современными: СДС, КМ, МПЗ, МДК, МД, ММд [53, 54, 56, 115, 116], основанными на данных кристаллографии, мутационного анализа, ММ и биофизических данных. Подобный синтез различных методов и подходов позволил решить сложнейшую задачу – определить процессы, лежащие в основе активации Kv-канала, без использования прямых структурных данных о закрытой конформации и промежуточных состояниях.

К настоящему времени исследователи все больше и больше приходят к единой модели активации Kv-канала. Группам ученых [53, 54, 56, 115, 116] удалось добиться сходных результатов, однако количество стадий, амплитуды движений и их направления различаются в разных моделях. Оценка вертикального передвижения S4 зависит от того, как оно было выровнено относительно открытой структуры канала, а также от флуктуаций, значительных в виду динамичности промежуточных конформаций [55].

Сравнение всех доступных моделей VSD-доменов канала в закрытой конформации [53, 54, 56, 115, 116] показало, что все они лежат в пределах $\sim 3.5 \text{ \AA}$ RMSD относительно положения атомов C α [125]. Остается только одно несоответствие, которое заключается в определении позиции боковой цепи остатка R1. Этот остаток в одних моделях [53, 55] взаимодействует с E226, а в других [56, 115] – с D283. Каждая группа ученых утверждает, что полученные ими данные подтверждаются экспериментально [50, 114, 118, 126]. Возможно, что обе конформации существуют одновременно при наличии потенциала гиперполяризации [127].

Модели активации рассматривают две – три промежуточные стадии [53, 54, 56, 115, 116]. Следует иметь

в виду, что промежуточные конформации нестабильны и трудно отделимы друг от друга [116], поэтому разные авторы вполне могут рассматривать одни и те же этапы активации. Так, в моделях МПЗ, ММд [56, 115] рассматриваются три промежуточные стадии, в то время как в модели МДК [116] таких стадий две, но все эти модели описывают очень схожие процессы. Вероятно, все модели представляют один и тот же процесс, но выбирают разные промежуточные точки. Несмотря на небольшие различия в моделях [53, 54, 56, 115, 116], все они хорошо описывают обобщенный процесс активации Kv-канала и объясняют основные принципы его функционирования. Особенно полно изложена модель ММд [56]. Согласно этим принципам, в каждом VSD-домене канала имеются глубокие водные полости с обеих сторон мембраны, разделенные тонким перешейком, содержащим консервативный Phe, который служит катализатором передвижения воротных зарядов S4. Положительные основные аминокислотные остатки S4 стабилизируются, взаимодействуя попарно с отрицательными зарядами в спиральях S1–S3, расположенных вдоль поверхности S4 [49, 69, 71]. Во время активации положительные заряды «перепрыгивают» от одного отрицательного заряда к следующему, что приводит к конформационному изменению в VSD. Движение S4 представляет собой комбинацию нескольких процессов: 1) наклон спирали S4 в мембране, 2) вращение вокруг своей оси и 3) вертикальное и радиальное передвижение. Это движение смещает линкер S4–S5 и таким образом приводит к открытию поры. Внутренняя часть спирали S4 растягивается, в то время как два ее конца закручиваются подобно винту. Открытие канала происходит после того, как переместились все четыре VSD-домена, в то время как закрытие канала требует перемещения только одного из них. Для установления точного механизма активации/деактивации, особенно процесса электро-механической связи доменов, необходимо получить атомарную структуру Kv-канала не только в двух конечных конформациях (открытой и закрытой), а также в промежуточных состояниях, что представляется чрезвычайно сложной задачей, так как эти состояния нестабильные и короткоживущие по сравнению со временем всего процесса активации. ●

*Авторы благодарят профессора МГУ
Г.В. Максимова за плодотворные обсуждения.*

*Работа частично финансирована грантом
Седьмой Рамочной программы Евросоюза (EDICT
#201924). А.В. Гризель получает финансирование
за счет Программы развития Санкт-
Петербургского государственного университета
(№ 1.50.1038.2014).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu F.H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G.A., Catterall W.A. // *Pharmacol. Rev.* 2005. V. 57. P. 387–395.
2. Gutman G.A., Chandry K.G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stühmer W., Wang X. // *Pharmacol. Rev.* 2005. V. 57. P. 473–508.
3. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R. W. // *Science.* 1990. V. 250. P. 533–538.
4. Yellen G. // *Nature.* 2002. V. 419. P. 35–42.
5. Bosma M.M., Hille B. // *Endocrinology.* 1992. V. 130. P. 3411–3420.
6. Pal S.K., Takimoto K., Aizenman E., Levitan E.S. // *Cell Death. Differ.* 2006. V. 13. P. 661–667.
7. Deutsch C., Chen L.Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 10036–10040.
8. Singer-Lahat D., Sheinin A., Chikvashvili D., Tsuk S., Greitzer D., Friedrich R., Feinshreiber L., Ashery U., Benveniste M., Levitan E.S., et al. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 1651–1658.
9. MacDonald P.E., Sewing S., Wang J., Joseph J.W., Smukler S.R., Sakellaropoulos G., Saleh M.C., Chan C.B., Tsushima R.G., Salapatek A.M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 44938–44945.
10. Kim S.J., Widenmaier S.B., Choi W.S., Nian C., Ao Z., Warnock G., McIntosh C.H. // *Cell Death. Differ.* 2012. V. 19. P. 333–344.
11. Wang Q., Curran M.E., Splawski I., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., de Jager T., et al. // *Nat. Genet.* 1996. V. 12. P. 17–23.
12. Wray D. // *Eur. Biophys. J.* 2009. V. 38. P. 271–272.
13. Watanabe H., Nagata E., Kosakai A., Nakamura M., Yokoyama M., Tanaka K., Sasai H. // *J. Neurochem.* 2000. V. 75. P. 28–33.
14. Beekwilder J.P., O'Leary M.E., van den Broek L.P., van Kempen G.T., Ypey D.L., van den Berg R.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 304. P. 531–538.
15. Camacho J. // *Cancer Lett.* 2006. V. 233. P. 1–9.
16. Milescu M., Lee H.C., Bae C.H., Kim J.I., Swartz K.J. // *J. Gen. Physiol.* 2013. V. 141. P. 203–216.
17. Thomas D., Wimmer A.B., Wu K., Hammerling B.C., Ficker E.K., Kuryshv Y.A., Kiehn J., Katus H.A., Schoels W., Karle C.A. // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004. V. 369. P. 462–472.
18. Ikeda M., Tomita Y., Mouri A., Koga M., Okochi T., Yoshimura R., Yamanouchi Y., Kinoshita Y., Hashimoto R., Williams H.J., et al. // *Biol. Psychiatry.* 2010. V. 67. P. 263–269.
19. Sokolova O. // *FEBS Lett.* 2004. V. 564. P. 251–256.
20. Carrington J.C., Freed D.D. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 1590–1597.
21. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. // *Science.* 2005. V. 309. P. 897–903.
22. Brandt F., Etschells S.A., Ortiz J.O., Elcock A.H., Hartl F.U., Baumeister W. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 261–271.
23. Myasnikov A.G., Afonina Z.A., Klaholz B.P. // *Ultramicroscopy.* 2013. V. 126. P. 33–39.
24. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. // *Science.* 1998. V. 280. P. 69–77.
25. Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 663–676.
26. Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. // *Nature.* 2001. V. 413. P. 809–813.
27. Labro A.J., Raes A.L., Grottesi A., van Hoorick D., Sansom M.S., Snyder D.J. // *J. Gen. Physiol.* 2008. V. 132. P. 667–680.
28. Barghaan J., Bahring R. // *J. Gen. Physiol.* 2009. V. 133. P. 205–224.
29. Batulan Z., Haddad G.A., Blunck R. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 14005–14019.
30. Haddad G.A., Blunck R. // *J. Gen. Physiol.* 2011. V. 137. P. 455–472.
31. Pischalnikova A.V., Sokolova O.S. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4. P. 71–82.
32. Leicher T., Bahring R., Isbrandt D., Pongs O. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 35095–35101.
33. Shi G., Nakahira K., Hammond S., Rhodes K. J., Schechter L.E., Trimmer J.S. // *Neuron.* 1996. V. 16. P. 843–852.
34. Wray D. // *Eur. Biophys. J.* 2004. V. 33. P. 194–200.
35. Rasmusson R.L., Morales M.J., Wang S., Liu S., Campbell D.L., Brahmajothi M.V., Strauss H.C. // *Circ. Res.* 1998. V. 82. P. 739–750.
36. Sigworth F.J. // *Q. Rev. Biophys.* 1994. V. 27. P. 1–40.
37. Rettig J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J.O., Pongs O. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 289–294.
38. Armstrong C.M., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 1977. V. 70. P. 567–590.
39. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. // *Science.* 1990. V. 250. P. 568–571.
40. Blunck R., Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Perozo E., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 2006. V. 128. P. 569–581.
41. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Zhao Y., Jogini V., Cortes D.M., Roux B., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. P. 311–318.
42. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. P. 319–322.
43. Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. // *Nature.* 2003. V. 423. P. 33–41.
44. Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature.* 2007. V. 450. P. 376–382.
45. Laine M., Lin M.C., Bannister J.P., Silverman W.R., Mock A.F., Roux B., Papazian D.M. // *Neuron.* 2003. V. 39. P. 467–481.
46. Ruta V., Chen J., MacKinnon R. // *Cell.* 2005. V. 123. P. 463–475.
47. Posson D.J., Ge P., Miller C., Bezanilla F., Selvin P.R. // *Nature.* 2005. V. 436. P. 848–851.
48. Chanda B., Asamoah O.K., Blunck R., Roux B., Bezanilla F. // *Nature.* 2005. V. 436. P. 852–856.
49. Yarov-Yarovoy V., Baker D., Catterall W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 7292–7297.
50. Campos F.V., Chanda B., Roux B., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 7904–7909.
51. Grabe M., Lai H.C., Jain M., Jan Y.N., Jan L.Y. // *Nature.* 2007. V. 445. P. 550–553.
52. Lewis A., Jogini V., Blachowicz L., Laine M., Roux B. // *J. Gen. Physiol.* 2008. V. 131. P. 549–561.
53. Pathak M.M., Yarov-Yarovoy V., Agarwal G., Roux B., Barth P., Kohout S., Tombola F., Isacoff E.Y. // *Neuron.* 2007. V. 56. P. 124–140.
54. Khalili-Araghi F., Jogini V., Yarov-Yarovoy V., Tajkhorshid E., Roux B., Schulten K. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 2189–2198.
55. Vargas E., Bezanilla F., Roux B. // *Neuron.* 2011. V. 72. P. 713–720.
56. Jensen M.O., Jogini V., Borhani D.W., Leffler A.E., Dror R.O., Shaw D.E. // *Science.* 2012. V. 336. P. 229–233.
57. Yarov-Yarovoy V., DeCaen P.G., Westenbroek R.E., Pan C.Y., Scheuer T., Baker D., Catterall W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E93–102.
58. Goldstein S.A., Miller C. // *Biophys. J.* 1992. V. 62. P. 5–7.
59. Gandhi C.S., Isacoff E.Y. // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 455–463.
60. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. // *Neuron.* 2000. V. 25. P. 411–423.

61. Schonherr R., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y., Heinemann S.H. // *Neuron*. 2002. V. 35. P. 935–949.
62. Schoppa N.E., McCormack K., Tanouye M.A., Sigworth F.J. // *Science*. 1992. V. 255. P. 1712–1715.
63. Seoh S.A., Sigg D., Papazian D.M., Bezanilla F. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 1159–1167.
64. Aggarwal S.K., MacKinnon R. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 1169–1177.
65. Starace D.M., Stefani E., Bezanilla F. // *Neuron*. 1997. V. 19. P. 1319–1327.
66. Starace D.M., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 469–490.
67. Larsson H.P., Baker O.S., Dhillon D.S., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 387–397.
68. Baker O.S., Larsson H.P., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 1998. V. 20. P. 1283–1294.
69. Papazian D.M., Shao X.M., Seoh S.A., Mock A.F., Huang Y., Wainstock D.H. // *Neuron*. 1995. V. 14. P. 1293–1301.
70. Tiwari-Woodruff S.K., Schulteis C.T., Mock A.F., Papazian D.M. // *Biophys. J.* 1997. V. 72. P. 1489–1500.
71. Tiwari-Woodruff S.K., Lin M.A., Schulteis C.T., Papazian D.M. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 115. P. 123–138.
72. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 115. P. 33–50.
73. Gandhi C.S., Clark E., Loots E., Pralle A., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 2003. V. 40. P. 515–525.
74. Elinder F., Mannikko R., Larsson H.P. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 118. P. 1–10.
75. Elinder F., Arhem P., Larsson H.P. // *Biophys. J.* 2001. V. 80. P. 1802–1809.
76. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. // *Science*. 1996. V. 271. P. 213–216.
77. Yusuf S.P., Wray D., Sivaprasadarao A. // *Pflugers Arch.* 1996. V. 433. P. 91–97.
78. Cha A., Ruben P.C., George A.L., Jr., Fujimoto E., Bezanilla F. // *Neuron*. 1999. V. 22. P. 73–87.
79. Glauner K.S., Mannuzzu L.M., Gandhi C.S., Isacoff E.Y. // *Nature*. 1999. V. 402. P. 813–817.
80. Bezanilla F., Perozo E., Stefani E. // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 1011–1021.
81. Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. // *Nature*. 2003. V. 423. P. 42–48.
82. Lee S.Y., Lee A., Chen J., MacKinnon R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 15441–15446.
83. Yang N., George A.L., Jr., Horn R. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 113–122.
84. Starace D.M., Bezanilla F. // *Nature*. 2004. V. 427. P. 548–553.
85. Ahern C.A., Horn R. // *J. Gen. Physiol.* 2004. V. 123. P. 205–216.
86. Gonzalez C., Rosenman E., Bezanilla F., Alvarez O., Latorre R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 9617–9623.
87. Durell S.R., Shrivastava I.H., Guy H.R. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. P. 2116–2130.
88. Durell S.R., Hao Y., Guy H.R. // *J. Struct. Biol.* 1998. V. 121. P. 263–284.
89. Asamoah O.K., Wuskell J.P., Loew L.M., Bezanilla F. // *Neuron*. 2003. V. 37. P. 85–97.
90. Islas L.D., Sigworth F.J. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 69–89.
91. Bezanilla F. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 555–592.
92. Jiang Q.X., Wang D.N., MacKinnon R. // *Nature*. 2004. V. 430. P. 806–810.
93. Neale E.J., Elliott D.J., Hunter M., Sivaprasadarao A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 29079–29085.
94. Clayton G.M., Altieri S., Heginbotham L., Unger V.M., Morais-Cabral J.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 1511–1515.
95. Villalba-Galea C.A., Sandtner W., Starace D.M., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 17600–17607.
96. Bjelkmar P., Niemela P.S., Vattulainen I., Lindahl E. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. V. 5. P. e1000289.
97. Vieira-Pires R.S., Morais-Cabral J.H. // *J. Gen. Physiol.* 2010. V. 136. P. 585–592.
98. Broomand A., Elinder F. // *Neuron*. 2008. V. 59. P. 770–777.
99. Chen X., Wang Q., Ni F., Ma J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 11352–11357.
100. Tombola F., Pathak M.M., Gorostiza P., Isacoff E.Y. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 546–549.
101. Ramsey I.S., Mokrab Y., Carvacho I., Sands Z.A., Sansom M.S., Clapham D.E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 869–875.
102. Wood M.L., Schow E.V., Freitas J.A., White S.H., Tombola F., Tobias D.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. P. 286–293.
103. Horn R., Ding S., Gruber H.J. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 116. P. 461–476.
104. del Camino D., Kanevsky M., Yellen G. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 126. P. 419–428.
105. Pathak M., Kurtz L., Tombola F., Isacoff E. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 125. P. 57–69.
106. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. // *J. Gen. Physiol.* 1994. V. 103. P. 321–362.
107. Schmidt D., Jiang Q.X., MacKinnon R. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 775–779.
108. Guy H.R., Seetharamulu P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 508–512.
109. Khalili-Araghi F., Jogini V., Yarov-Yarovoy V., Tajkhorshid E., Roux B., Schulten K. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 2189–2198.
110. Ahern C.A., Horn R. // *Neuron*. 2005. V. 48. P. 25–29.
111. Freitas J.A., Tobias D.J., White S.H. // *Biophys. J.* 2006. V. 91. P. L90–92.
112. Sands Z.A., Sansom M.S. // *Structure*. 2007. V. 15. P. 235–244.
113. Jogini V., Roux B. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 3070–3082.
114. Tao X., Lee A., Limapichat W., Dougherty D.A., MacKinnon R. // *Science*. 2010. V. 328. P. 67–73.
115. Delemotte L., Tarek M., Klein M.L., Amaral C., Treptow W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 6109–6114.
116. Henrion U., Renhorn J., Börjesson S.I., Nelson E.M., Schwaiger C.S., Bjelkmar P., Wallner B., Lindahl E., Elinder F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. P. 8552–8557.
117. Cole K.S., Moore J.W. // *Biophys. J.* 1960. V. 1. P. 1–14.
118. Lin M.C., Hsieh J.Y., Mock A.F., Papazian D.M. // *J. Gen. Physiol.* 2011. V. 138. P. 155–163.
119. Tao X., MacKinnon R. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 24–33.
120. Madin K., Sawasaki T., Kamura N., Takai K., Ogasawara T., Yazaki K., Takei T., Miura K. I., Endo Y. // *FEBS Lett.* 2004. V. 562. P. 155–159.
121. Jensen M.O., Borhani D.W., Lindorff-Larsen K., Maragakis P., Jogini V., Eastwood M.P., Dror R.O., Shaw D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 5833–5838.
122. Schwarz T.L., Tempel B.L., Papazian D.M., Jan Y.N., Jan L.Y. // *Nature*. 1988. V. 331. P. 137–142.
123. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. // *Nature*. 2001. V. 414. P. 43–48.
124. Berneche S., Roux B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 8644–8648.
125. Vargas E., Yarov-Yarovoy V., Khalili-Araghi F., Catterall W.A., Klein M.L., Tarek M., Lindahl E., Schulten K., Perozo E., Bezanilla F., et al. // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 140. P. 587–594.
126. Delemotte L., Treptow W., Klein M.L., Tarek M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. L72–74.
127. Tarek M., Delemotte L. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. P. 2755–2762.

УДК 612.017.1

Регуляция экспрессии целевого белка (трансгена) в составе ДНК аденовирусного вектора с помощью агонистов Toll-подобных рецепторов

А. В. Багаев¹, А. В. Пичугин¹, Е. С. Лебедева¹, А. А. Лысенко², М. М. Шмаров²,
Д. Ю. Логунов², Б. С. Народицкий², Р. И. Атауллаханов^{1*}, Р. М. Хаитов¹, А. Л. Гинцбург²

¹Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.08.2014

РЕФЕРАТ Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) являются эффективным молекулярным инструментом для генной терапии и генной вакцинации. С помощью таких векторов нужные гены можно доставить и экспрессировать в клетках различных эпителиев, печени, в иммунных и кровеносных клетках животных и человека. Успех генной терапии и генной вакцинации зависит от интенсивности продукции целевого белка, кодируемого вектором. В представленной работе изучено влияние агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR) на эффективность трансдукции и экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках животных и человека. Установлено, что агонисты TLR2, 4, 5, 7, 8 и 9 значительно усиливают продукцию белка в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой гена этого белка. Эффект усиления реализуется в дендритных клетках и макрофагах, экспрессирующих цитоплазматический (GFP), мембранный (HA) или секреторный (SEAP) белки. На лабораторных мышах показано усиление экспрессии целевого белка с помощью фармацевтического агониста TLR4. В отличие от агонистов других TLR, агонист TLR3 подавляет продукцию GFP или SEAP в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой гена этих белков. Предполагается, что усиление экспрессии целевого белка связано с активацией сигнального пути MyD88 → NF-κB, а подавление – с активацией сигнального пути TRIF → IRF. При активации обоих сигнальных путей агонистом TLR4 доминирует сигнал MyD88 → NF-κB, стимулирующий продукцию белка, кодируемого трансгеном в составе rAd.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА агонисты Toll-подобных рецепторов, генная терапия, генная иммунизация, рекомбинантные нереплицирующиеся аденовирусные векторы, экспрессия трансгенов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ rAd – нереплицирующийся рекомбинантный аденовирусный вектор; TLR – Toll-подобный рецептор; БОЕ – бляшкообразующая единица; ПС – полная культуральная среда; БСА – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатный буферный раствор; LTA – липотейхоевая кислота; Poly[I : C] – полиинозиновая : полицитидиловая кислота; LPS – липополисахарид; MPL-A – монофосфорильное производное липида A; TNF-α – фактор некроза опухоли α; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; CLI-095 – известен также, как TAK-242, селективный ингибитор TLR4-сигнализации; SEAP – секреторная эмбриональная щелочная фосфатаза; GFP – зеленый флуоресцентный белок; DAPI – 4',6'-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид; HA – гемагглютинин вируса гриппа H1N1; CMV – цитомегаловирус; IL – интерлейкин.

ВВЕДЕНИЕ

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) применяются для экспрессии трансгена в клетках различного типа. В зависимости от гена rAd могут использоваться в генной

терапии (гены опухолевых супрессоров, факторов роста и др.) или генетической иммунизации (гены протективных антигенов возбудителей). В случае иммунизации антиген вырабатывается трансдуцированными клетками иммунизированного организ-

ма в течение 2–3 недель, что приводит к развитию интенсивного иммунного ответа. По такому принципу сконструированы вакцинные препараты против туберкулеза, малярии, гриппа и многих других актуальных инфекций. Большинство препаратов на основе rAd пока находятся на различных стадиях клинического изучения [1–5], и лишь один препарат зарегистрирован и разрешен к применению [6]. Однако уже накоплено достаточно сведений, чтобы считать иммуногены и вакцины на основе rAd безопасными и эффективными.

Иммунные реакции на нужный антиген, кодируемый rAd, можно усиливать с помощью агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR) [3]. Мы создали оригинальную экспериментальную вакцину против гриппа, в состав которой входят rAd, кодирующие протективные антигены вируса гриппа, и фармацевтический агонист TLR4 – Иммуномакс® [7–9] – выделенный из растений водорастворимый высокомолекулярный кислый полисахарид с молекулярной массой более 1 МДа [10]. Использование Иммуномакса в качестве молекулярного адъюванта позволяет усилить реакции Т-клеток на антигены вируса гриппа и повысить защитные свойства вакцины. Кроме того, включение данного адъюванта в состав вакцины позволяет в 3–10 раз уменьшить дозу rAd, кодирующих антигены вируса гриппа, без потери ее иммуногенных и протективных свойств.

Иммуномакс не оказывает прямого воздействия на Т-клетки. Этот препарат активирует антигенпредставляющие клетки, в частности дендритные клетки и макрофаги. В дендритных клетках Иммуномакс индуцирует усиленную экспрессию коактиваторных молекул, а именно: CD80, CD86, CD40, МНС класса II, а также секрецию иммуностимулирующих цитокинов IL1 β , TNF- α , IL6, 8 и 12 [10]. Этих событий в антигенпредставляющих клетках вполне достаточно для проявления иммуностимулирующего действия Иммуномакса. Однако нельзя исключить, что Иммуномакс усиливает также продукцию антигенов, кодируемых трансгеном в составе rAd.

При иммунизации rAd синтез белка-антигена происходит непосредственно в антигенпредставляющих клетках, поэтому мы предположили, что Иммуномакс, наряду с коактиваторными молекулами и цитокинами, может стимулировать и продукцию белка-антигена. Такое влияние препарата могло бы вносить вклад в усиление ответа Т-клеток, распознающих антиген на поверхности антигенпредставляющих дендритных клеток.

В представленной работе нами изучена экспрессия белков, гены которых встроены в rAd, в ден-

дритных клетках и макрофагах, на которые воздействовали Иммуномаксом, а также агонистами других TLR. Полученные результаты свидетельствуют, что Иммуномакс в 2–11 раз усиливает интенсивность продукции белка-антигена в дендритных клетках и макрофагах. Усиление экспрессии наблюдалось при использовании rAd, кодирующих мембранный, цитоплазматический и секреторный белки. Подобно Иммуномаксу другой агонист TLR4 – липополисахарид из *Escherichia coli* – тоже стимулировал экспрессию трансгенных белков, кодируемых rAd. Более того, агонисты других рецепторов TLR, в частности TLR2, 5, 7, 8 и 9, усиливали экспрессию таких белков, тогда как агонист TLR3 не усиливал, а подавлял их продукцию. Сравнение внутриклеточных сигнальных путей от разных TLR позволило предположить, что сигнал, начинающийся с MyD88 и оканчивающийся фактором NF- κ B, стимулирует, а сигнальный путь, использующий TRIF и оканчивающийся факторами транскрипции IRF-3 и IRF-7, подавляет продукцию белков, определяемую аденовирусным вектором. Сигнальный путь через MyD88 доминирует над сигналом через TRIF, поэтому при воздействии агониста TLR4, когда используются обе сигнальные ветви (MyD88 и TRIF), наблюдается усиление экспрессии трансгена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антитела и реагенты

Использованы следующие моноклональные антитела: CD11b-BD Horizon V450, Ly-6G APC-Cy7 (BD Pharmingen™), CD11c PE, CD19 eFluo450 (eBiosciences), F4/80 APC (BioLegend), Anti Mouse МНС II (I-A)-FITC (eBiosciences). Моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа H1N1 (HA) любезно предоставлены А.А. Куц (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ России).

В работе были использованы агонисты Toll-подобных рецепторов: липотейхоевая кислота (LTA, лиганд TLR2), синтетический аналог двухцепочечной РНК – полиинозиновая : полицитидиловая кислота (Poly[I : C], лиганд TLR3), монофосфорильное производное липида А (MPL-A, лиганд TLR4), флагеллин (лиганд TLR5), имиквимод (лиганд TLR7/8), синтетический олигонуклеотид ODN-CpG 1826 (лиганд TLR9) – все препараты фирмы InvivoGen, а также липополисахарид из *E. coli* серотип 055:B5 (LPS, лиганд TLR4, Sigma, L-2880). Кроме того, в работе использовали рекомбинантный фактор некроза опухоли α (TNF- α , Sigma, T7539). В специальных экспериментах применяли CLI-095 (InvivoGen) – специфический ингибитор сигнального пути TLR4.

При микроскопии использовали краситель ДНК – дигидрохлорид DAPI (Sigma).

Животные

Мышей линии BALB/c в возрасте 8–10 недель, полученных из питомника «Столбовая», содержали на стандартной диете в стандартных условиях вивария ГНЦ Института иммунологии ФМБА.

Культуры клеток

Все культуры клеток инкубировали в полной среде (ПС), составленной из DMEM с 25 мМ HEPES, дополненной коктейлем заменимых аминокислот, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкМ β-меркаптоэтанола и 10 мкг/мл гентамицина (все реактивы «ПанЭко») при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Линию клеток 293/TLR4-MD2-CD14 (InvivoGen), стабильно трансфицированную TLR4 с корцепторами CD14 и MD-2, поддерживали *in vitro* в присутствии селективных антибиотиков бластицидин и гиромоцин в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для мониторинга активности NF-κB клетки трансдуцировали лентивирусным вектором (Cleveland BioLabs), несущим репортерный ген β-галактозидазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Далее клетки культивировали в соответствии с рекомендациями разработчиков в присутствии дополнительного селективного антибиотика пурамицин.

Суспензии первичных клеток селезенки, костного мозга и брюшной полости мышей готовили общепринятыми методами. Дендритные клетки получали *in vitro* дифференцировкой клеток костного мозга мышей BALB/c в присутствии гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Костный мозг вымывали из бедренных и больших берцовых костей мыши, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, ядро-содержащие клетки дважды отмывали фосфатным буферным раствором (PBS, Amresco, E404), после чего культивировали в полной среде с добавлением 10 нг/мл GM-CSF (Sigma) в течение 7 дней как описано в [4]. К окончанию этого срока неадгезионные клетки содержали 70–75% дендритных клеток. Адгезионная часть культуры была на 95% представлена макрофагами. Для получения макрофагов сначала осторожно удаляли неадгезионные клетки, оставшийся монослой адгезионных клеток отмывали PBS (0.5% БСА), затем приливали раствор Версена («ПанЭко») и выдерживали в течение 1 ч при 4°C, после чего макрофаги смывали PBS (0.5% БСА).

Перитонеальные макрофаги получали путем вымывания клеток из перитонеальной полости intactных мышей BALB/c с помощью PBS, дополненного 1% глюкозы, 10 мМ HEPES и 0.5% бычьего сывороточного альбумина. Клетки осаждали центрифугированием, суспензировали в ПС, культивировали в течение 18–20 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем не прилипшие к пластику клетки удаляли, осторожно промывая культуральной средой и PBS. Более 90% оставшихся на пластике, адгезионных, клеток были представлены макрофагами.

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы со вставкой трансгена

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы rAd-SEAP, rAd-GFP и rAd-NA со вставкой генов секреторной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), зеленого флуоресцентного белка (GFP) или гемагглютинина вируса гриппа H1N1 (NA) получали на основе плазмиды pShuttle-CMV согласно рекомендациям производителя AdEasy Adenoviral vector system (Stratagene, cat. 240009), используя плазмидные конструкции pGREEN (Carolina Biological Supply Company), p310D (pRcCMV-SEAP) и pAL-NA (обе собственного изготовления). Наличие генов белков GFP, SEAP, NA в соответствующих плазмидных конструкциях pShuttle-CMV-GFP, pShuttle-CMV-SEAP, pShuttle-CMV-NA подтверждали рестрикционным анализом с использованием эндонуклеаз EcoRI, NotI и EcoRV и с помощью ПЦР.

Присутствие генов GFP, SEAP и NA в rAd подтверждали методом ПЦР. Титры препаратов rAd-GFP, rAd-SEAP и rAd-NA определяли методом бляшкообразования в культуре клеток линии HEK-293 [11].

Трансдукция клеток нереплицирующимися рекомбинантными аденовирусными векторами

Культуры клеток трансдуцировали rAd-SEAP, rAd-GFP или rAd-NA из расчета 7–200 БОЕ на клетку. Трансдукцию клеток проводили в 50 мкл бессывороточной среды OpTmizer™ (GIBCO) в течение 1 ч, затем в культуры клеток вносили 150 мкл ПС. Трансдуцированные клетки культивировали в присутствии агониста TLR4 Иммуномакс (10 мкг/мл) или без него в течение 1–6 дней. При изучении влияния других агонистов TLR клетки инкубировали в присутствии LTA (1 мкг/мл), Poly[I : C] (10 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), MPL-A (5 мкг/мл), флагеллина (0.1 мкг/мл), имиквимода (1 мкг/мл), ODN-CpG 1826 (10 нг/мл). Кроме того, для активации клеток, минуя TLR, использовали TNF-α (10 нг/мл). Для ингибирования сигнала TLR4 в культуры клеток вносили CLI-095 (1 мкг/мл).

Трансдукция нереплицирующимися рекомбинантными аденовирусными векторами *in vivo*

Для трансдукции восприимчивых клеток *in vivo* в перитонеальную полость мышей BALB/c вводили rAd-SEAP в количестве 10^8 БОЕ в 200 мкл физиологического раствора вместе с 10 мкг Иммуномакса или без него (по четыре мыши в каждой экспериментальной группе).

Экспрессию введенного трансгена оценивали по концентрации белка SEAP в крови мышей. С этой целью через 3 сут после введения rAd-SEAP у мышей забирали кровь из ретроорбитального синуса, получали сыворотку и измеряли содержание SEAP в образцах сыворотки.

Измерение интенсивности продукции белков SEAP, GFP и HA, кодируемых rAd

Продукцию секреторного белка SEAP в сыворотке крови или культуральной среде определяли согласно [12] с незначительными модификациями. Тестируемую жидкость осветляли центрифугированием при 14000 *g* в течение 2 мин, затем прогревали при 65°C в течение 5 мин. Субстрат *n*-нитрофенилфосфат вносили в реакционном буфере (0.5 М CaCO₃, 0.5 мМ MgCl₂, pH 9.8), оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм. Активность SEAP выражали в мЕ/мл, считая, что 1 мЕ/мл соответствует увеличению оптической плотности на 0.04 ед./мин.

Продукцию GFP в клетках определяли методом проточной цитофлуориметрии на FACS Aria II (BD Biosciences). Интенсивность флуоресценции определяли в диапазоне длин волн 515–545 нм при лазерном возбуждении на волне 488 нм. Популяции клеток идентифицировали, окрашивая суспензию смесью меченных флуорохромом антител к поверхностным белкам CD11b, CD11c, CD19, Ly6G, F4/80, с последующим анализом на цитофлуориметре FACS Aria II. Кроме того, продукцию GFP в дендритных клетках и макрофагах, меченных антителами к CD11c или F4/80 соответственно, подтверждали с помощью конфокальной микроскопии.

Экспрессию мембранного белка HA определяли, окрашивая клетки моноклональными антителами к HA, с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Aria II.

Конфокальная микроскопия

Культуры клеток инкубировали в полной среде на культуральных слайдах (SPL Life Sciences Ltd., Ю. Корея) со съёмным дном в виде предметного стекла. После инкубации клетки фиксировали в течение 20 мин в PBS, содержащем 3.7% па-

раформальдегида (Sigma), промывали PBS с 0.5% БСА и окрашивали антителами в течение 1 ч. После дополнительной отмывки в PBS клетки окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в PBS для анализа на конфокальном микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой QuantEM 512SC (Photometrics, Великобритания).

Статистическая обработка данных

Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандартного отклонения. Статистическую значимость различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Усиление экспрессии белка, кодируемого трансгеном в составе rAd, при воздействии Иммуномакса

Нереплицирующиеся rAd трансдуцируют эпителиальные клетки и эффективно экспрессируют в них трансген. Для использования rAd с целью иммунизации важно добиться экспрессии нужного белка-антигена в антигенпредставляющих клетках, в частности в дендритных клетках и макрофагах. В данной работе мы установили, что rAd вполне успешно экспрессируются в первичных дендритных клетках и макрофагах мыши. При введении rAd-GFP в культуры клеток селезенки, костного мозга или перитонеальных макрофагов мы наблюдали экспрессию трансгена в дендритных клетках, макрофагах и гранулоцитах селезенки, дендритных клетках и макрофагах, полученных при культивировании клеток костного мозга в присутствии GM-CSF, а также в макрофагах брюшной полости (*рис. 1 и 2*). Экспрессия rAd в лимфоидных клетках и, в частности, в В-клетках, CD4 и CD8 Т-клетках, NK-клетках не регистрировалась. Природа клеток, экспрессирующих белок GFP, доказана нами путем одновременного окрашивания моноклональными антителами к CD11c – в случае дендритных клеток, F4/80 – макрофагов и Ly-6G – гранулоцитов. В качестве примера представлены микрофотографии дендритных клеток, содержащих на клеточной мембране молекулы CD11c и экспрессирующих GFP в цитозоле (*рис. 3А*).

Активация дендритных клеток Иммуномаксом одновременно с трансдукцией этих клеток rAd-GFP приводила к усиленной экспрессии белка GFP. При этом увеличивался как процент дендритных клеток, экспрессирующих GFP (*рис. 1, 2, 3Б, 4А*), так и интенсивность его продукции (*рис. 4Б*). Подобное усиление экспрессии rAd-GFP мы наблюдали и в макрофагах. Усиление экспрессии трансгена

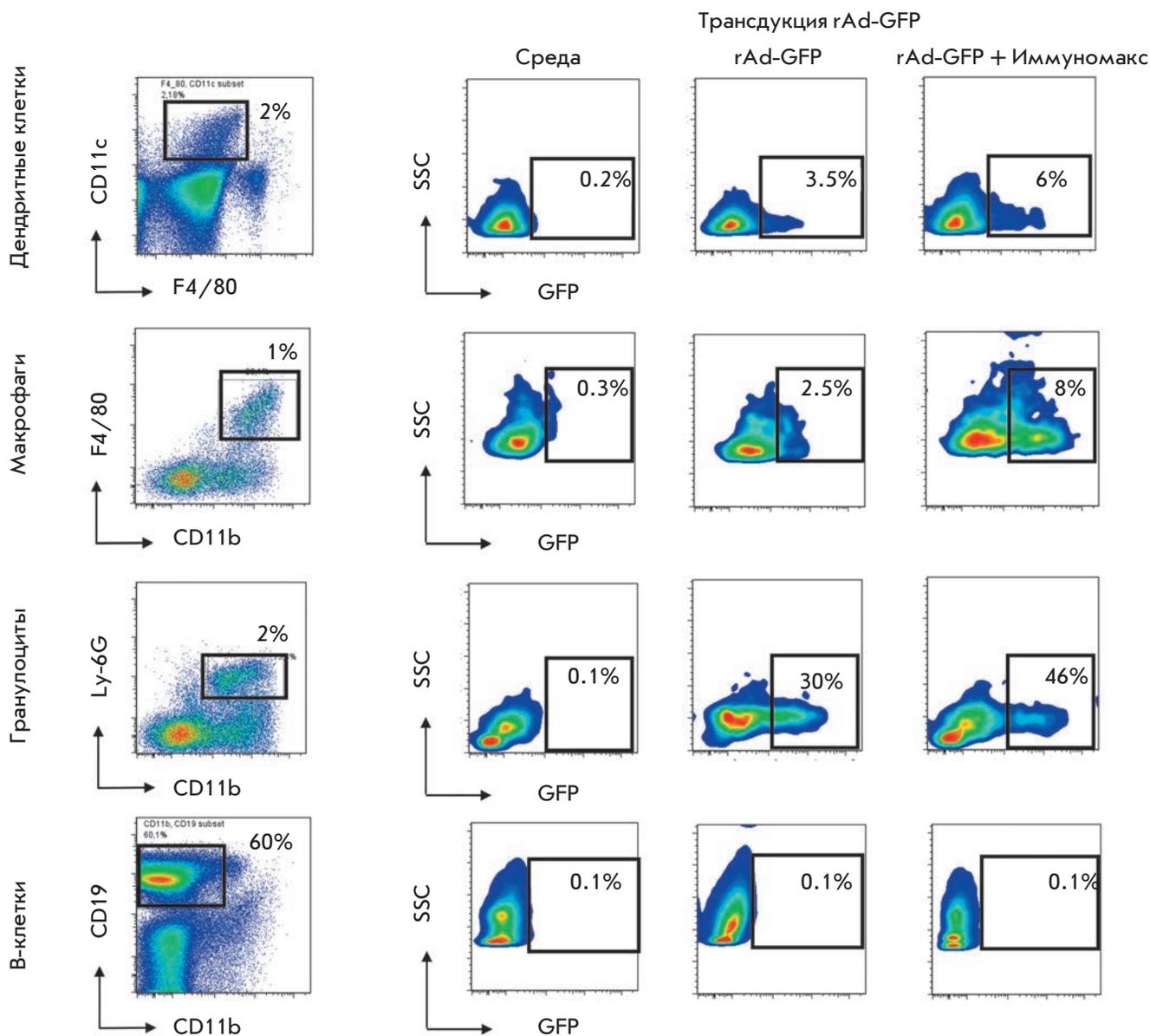


Рис. 1. Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на трансдукцию и экспрессию rAd-GFP в различных типах клеток селезенки мыши. Спленоциты мыши трансдуцировали rAd-GFP (5×10^5 БОЕ/мл) и инкубировали в течение 3 сут в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. Затем клетки окрашивали смесью меченных флуорохромом антител и анализировали на проточном цитометре FACS Aria II. Левая вертикаль – выделение (gating) CD11c⁺ дендритных клеток, F4/80⁺ макрофагов, CD11b⁺Ly-6G⁺ гранулоцитов и CD19⁺ В-клеток с указанием процентного содержания клеток этого типа в общей популяции клеток селезенки. В соответствующих рядах по горизонтали представлено содержание дендритных клеток, макрофагов, гранулоцитов и В-клеток с флуоресценцией GFP после трансдукции rAd-GFP и культивирования с Иммуномаксом или без него. Негативный контроль (среда) – культура клеток селезенки без трансдукции

не зависело от тканевой принадлежности дендритных клеток и макрофагов. Оно отчетливо регистрировалось в дендритных клетках селезенки и костного мозга, а также в макрофагах из селезенки, костного мозга или перитонеальной полости (см. рис. 1–4).

Иммуномакс не изменяет тропности rAd к типам клеток, в которых экспрессируется

При изучении экспрессии rAd в культурах клеток селезенки или костного мозга мыши мы обратили внимание на то, что Иммуномакс усиливает экспрес-

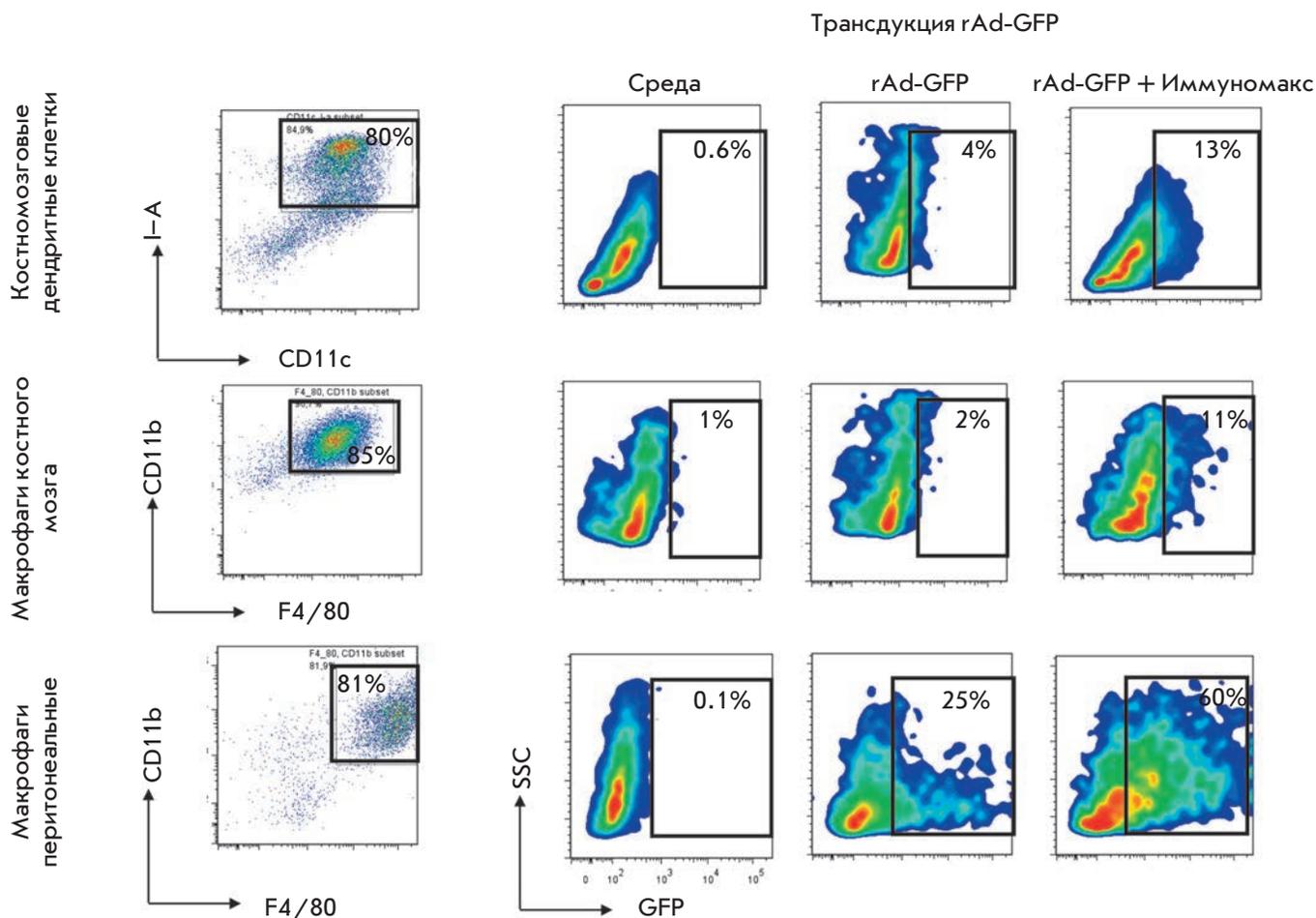


Рис. 2. Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на трансдукцию и экспрессию rAd-GFP в дендритных клетках и макрофагах, дифференцированных *in vitro* из клеток костного мозга, а также в макрофагах из перитонеальной полости мыши. Клетки трансдуцировали rAd-GFP (5×10^5 БОЕ/мл) и инкубировали в течение 4 сут в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. Затем клетки окрашивали смесью меченных флуорохромом антител и анализировали на проточном цитометре FACS Aria II. Левая вертикаль – выделение (gating) CD11c⁺I-A⁺ дендритных клеток и CD11b⁺F4/80⁺ макрофагов костного мозга, а также CD11b⁺F4/80⁺ макрофагов перитонеальной полости с указанием процентного содержания клеток этого типа в общей популяции клеток. В соответствующих рядах по горизонтали представлено содержание дендритных клеток и макрофагов с флуоресценцией GFP после трансдукции rAd-GFP и культивирования с Иммуномаксом или без него. Негативный контроль (среда) – культура клеток без трансдукции

сию трансгена только в клетках тех типов, в которых вектор экспрессировался в отсутствие Иммуномакса. Под влиянием Иммуномакса не изменялась тропность вектора к различным типам клеток. В частности, rAd-GFP экспрессировался в дендритных клетках и макрофагах, но не экспрессировался в CD4 и CD8 Т-клетках, В-клетках и НК-клетках. Под влиянием Иммуномакса экспрессия rAd-GFP усиливалась только в дендритных клетках, макрофагах и гранулоцитах, в других типах клеток вектор по-прежнему не экспрессировался. В качестве примера представлены результаты исследования В-клеток

(см. рис. 1), в которых rAd-GFP не экспрессировался ни до, ни после их активации Иммуномаксом.

Иммуномакс не влияет на репликацию rAd в специальных клетках НЕК-293

Усиление экспрессии трансгена в составе rAd под действием Иммуномакса выдвигает естественный вопрос, не будет ли Иммуномакс активировать репликацию самих аденовирусных частиц. Поскольку репликация rAd в обычных клетках невозможна, для размножения rAd используют специальную клеточную линию НЕК-293, в геном которой

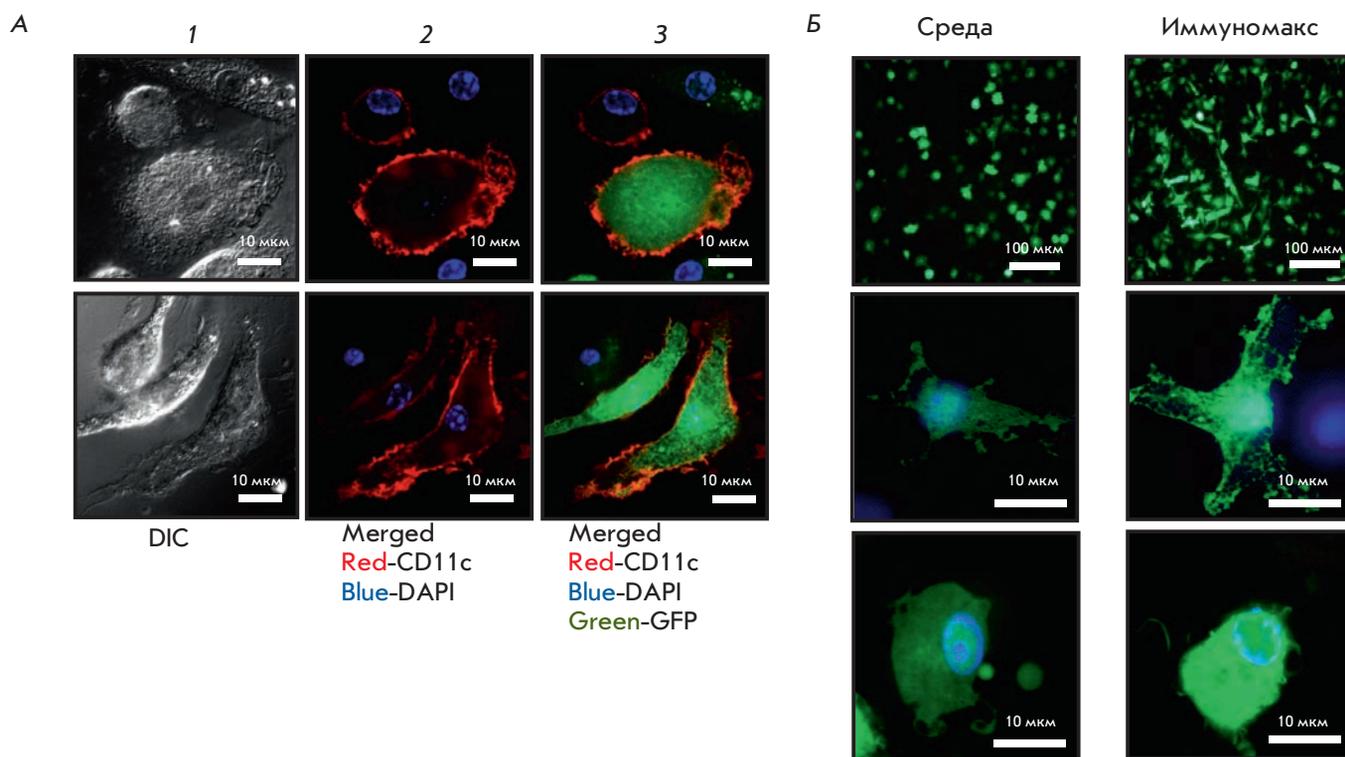


Рис. 3. Конфокальная микроскопия дендритных клеток, трансдуцированных rAd-GFP в присутствии Иммуномакса или без него. А — культуру костномозговых дендритных клеток инкубировали в полной среде в присутствии rAd-GFP (30 БОЕ на клетку). Через 24 ч клетки фиксировали и окрашивали антителами anti-CD11c-PE. Микроскопию проводили в буфере PBS с DAPI (1 мкг/мл) на конфокальном микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой QuantEM 512SC (Photometrics, Великобритания) с использованием системы лазеров 405. Слева направо представлены изображения клеток в режимах: DIC – дифференциально-интерференционный контраст (1); наложение каналов anti-CD11c-PE (красный) и DAPI (синий) (2); наложение каналов anti-CD11c-PE (красный), GFP (зеленый), DAPI (синий) (3). Б — культура костномозговых дендритных клеток после 24 ч инкубации с rAd-GFP с добавлением Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. На фотографиях представлены наложения каналов GFP (зеленый) и DAPI (синий) с увеличением $\times 20$ и $\times 200$

встроены гены области E1 аденовируса, удаленные из аденовирусного вектора.

Мы проверили, как Иммуномакс влияет на репликацию rAd в культуре клеток линии HEK-293-TLR4/MD2. В предварительных экспериментах было показано, что Иммуномакс действует через TLR4, активируя продукцию репортерного белка в клетках HEK-293-TLR4/MD2. Этот эффект Иммуномакса подавляется CLI-095, специфическим ингибитором TLR4-сигнального пути. Как и в клетках HEK-293, в клетках HEK-293-TLR4/MD2 происходит активная репликация rAd с развитием через 2–4 дня цитопатического эффекта. Мы титровали образец rAd-GFP в клетках линии HEK-293-TLR4/MD2 в присутствии Иммуномакса или без него. Исходный образец rAd-GFP вносили в три лунки 96-луночной пластиковой панели с 40–50% конфлуэнтным монослоем клеток HEK-293-TLR4/MD2. Титрование вируса проводили в 24 последовательных разведениях с шагом разведе-

ния в 5 раз. В культурах клеток, где происходила репликация rAd, можно было наблюдать продукцию белка GFP и гибель клеток в течение нескольких дней. Репликация rAd наблюдалась, начиная с максимальной концентрации rAd, и при его последовательных разведениях, вплоть до 13-го. В присутствии Иммуномакса и в его отсутствие (контрольные культуры) последнее разведение rAd-GFP, при котором отмечена экспрессия GFP и цитопатический эффект, составили 5^{13} , т.е. Иммуномакс не влиял на репликацию rAd в клетках HEK-293-TLR4/MD2, имеющих рецепторы TLR4 и отвечающих на Иммуномакс активацией NF- κ B.

Иммуномакс усиливает экспрессию трансенов, кодирующих цитоплазматический, секреторный или мембранный белки

Выше было описано усиление Иммуномаксом экспрессии трансгена, входящего в состав rAd и ко-

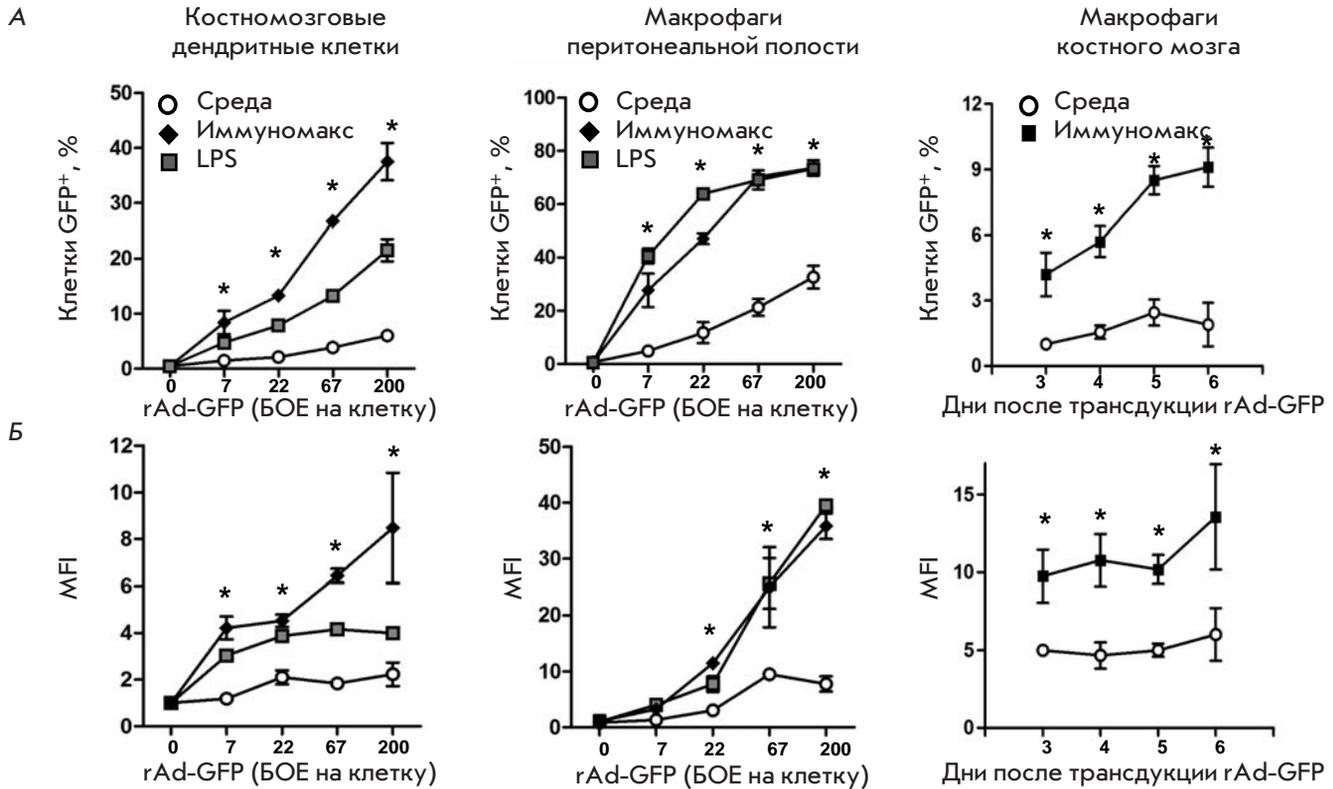


Рис. 4. Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на экспрессию GFP в дендритных клетках и макрофагах в зависимости от дозы rAd-GFP или времени после трансдукции клеток. Костномозговые дендритные клетки и перитонеальные макрофаги трансдуцировали rAd-GFP и инкубировали в течение 24 ч в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл), LPS (3 мкг/мл) или без активаторов (среда). Макрофаги костного мозга трансдуцировали rAd-GFP в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него, а затем инкубировали в течение 6 дней. Образцы клеток отбирали через 3, 4, 5 и 6 дней. Клетки анализировали на проточном цитометре FACS Aria II после окрашивания смесью меченных флуорохромом антител. По осям абсцисс – доза rAd-GFP, использованная для трансдукции клеток, или дни после трансдукции (правая вертикаль). По осям ординат – процент GFP-позитивных клеток (А); средняя интенсивность флуоресценции (MFI), нормированная на значение в контроле без активатора (Б). Представлены средние значения и стандартные отклонения по трем экспериментам. Здесь и на рис. 5 и 6 статистическая значимость отличий $P < 0.05$ обозначена *

дирующего цитоплазматический белок GFP. Мы установили, что Иммуномакс также усиливает экспрессию трансгенов, кодирующих секреторный и мембранный белки. В этих экспериментах использовали rAd-SEAP и rAd-НА, кодирующие секреторную эмбриональную фосфатазу и мембранный гемагглютинин вируса гриппа соответственно. Экспрессию SEAP оценивали по его концентрации в культуральной жидкости, а экспрессию НА в клеточной мембране измеряли методом проточной цитометрии клеток, меченных моноклональными антителами к НА.

На рис. 5А,Б представлены результаты изучения экспрессии rAd-SEAP в дендритных клетках и перитонеальных макрофагах мыши. Из представленных данных видно, что Иммуномакс усиливает

экспрессию секреторного белка SEAP, кодируемого rAd-SEAP. В опытах на моноцитах человека, трансдуцированных rAd-НА, Иммуномакс тоже вызывал усиление экспрессии мембранного белка НА, кодируемого вектором. Здесь важно отметить, что усиление экспрессии трансгена наблюдалось не только в клетках мыши, но и человека.

Усиление экспрессии rAd Иммуномаксом не только *in vitro*, но и *in vivo*

Принципиально важно было понять, можно ли индуцировать в организме животного описанное выше усиление экспрессии трансгена. Повышение продукции нужного белка было бы весьма полезным как при иммунизации rAd, так и при проведении генной терапии.

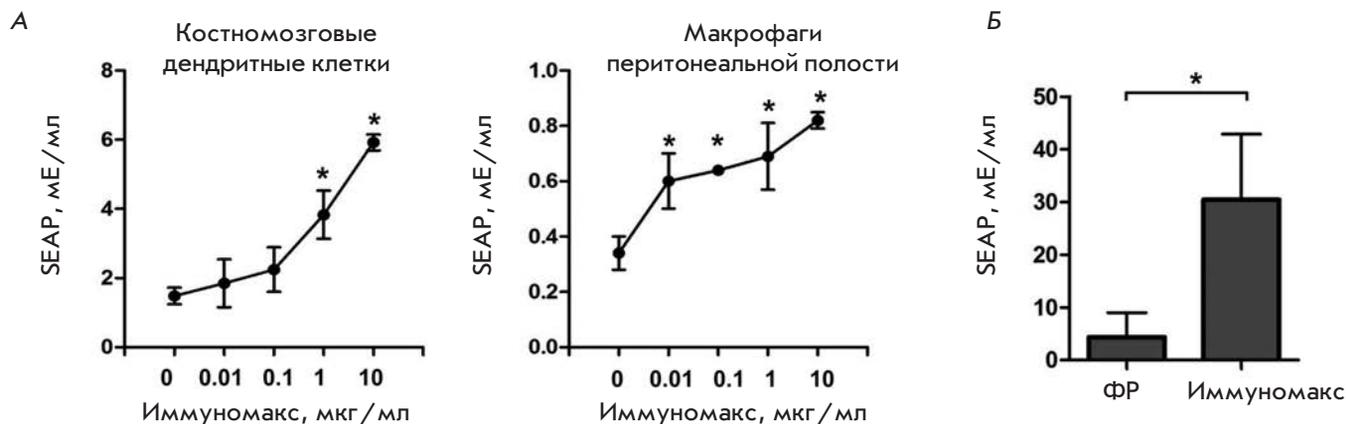


Рис. 5. Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на экспрессию в культурах клеток *in vitro* и в организме мышей секреторного белка (SEAP), кодируемого в ДНК аденовирусного вектора. **А** – костномозговые дендритные клетки и перитонеальные макрофаги мыши трансдуцировали rAd-SEAP (5×10^5 БОЕ/мл) и инкубировали в течение 4 сут в присутствии Иммуномакса в указанных концентрациях. Интенсивность продукции белка SEAP определяли по его содержанию (мЕ/мл) в культуральной жидкости. **Б** – концентрация белка SEAP в крови мышей через 3 дня после введения rAd-SEAP совместно с Иммуномаксом или без него. Опытным мышам ($n = 4$) в перитонеальную полость вводили rAd-SEAP в количестве 10^8 БОЕ на мышь с 10 мкг Иммуномакса в 200 мкл физиологического раствора NaCl. Контрольным мышам ($n = 4$) вместо Иммуномакса вводили 200 мкл физиологического раствора (ФР). Через 3 сут определяли содержание SEAP в сыворотке крови мышей

Мы исследовали влияние Иммуномакса на экспрессию трансгена у мышей BALB/c. В качестве вектора использовали rAd-SEAP, который вводили внутрибрюшинно в дозе 10^8 БОЕ в 200 мкл физиологического раствора. Интенсивность синтеза белка SEAP определяли по его концентрации в крови животных через 3 дня после инъекции rAd-SEAP. Опытным мышам вместе с rAd-SEAP вводили Иммуномакс (10 мкг/мышь). Контрольным мышам вместе с вектором вводили физиологический раствор. Результаты, представленные на рис. 5Б, свидетельствуют, что введение Иммуномакса приводило к статистически значимому повышению продукции в организме мыши белка SEAP, кодируемого вектором rAd-SEAP.

Усиление экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках происходит под влиянием агонистов TLR2, 4, 5, 7/8 и 9. Агонист TLR3 угнетает экспрессию rAd

Иммуномакс является агонистом TLR4, который усиливает экспрессию трансгена в составе rAd в дендритных клетках и макрофагах. Было интересно узнать, оказывает ли подобное действие другой агонист TLR4, а именно LPS. Кроме того, следовало изучить возможное влияние агонистов других TLR на экспрессию трансгенов, введенных в клетки в составе rAd. На рис. 4 и 6 представлены данные, доказывающие, что LPS усиливает экспрессию трансгенов, как и Иммуномакс. Интересно, что монофосфориль-

ное производное липида А (MPL-A), минимальное действующее начало LPS, тоже активировало экспрессию rAd-GFP. Более того, агонисты TLR2, 5, 7/8 и 9, подобно агонистам TLR4, стимулировали экспрессию генов SEAP и GFP в составе rAd-SEAP и rAd-GFP соответственно (рис. 6А,Б). Повышение экспрессии агонистами TLR2, 4, 5, 7/8 и 9 варьировало в разных экспериментах в 2–11 раз ($P < 0.05$).

Следует отметить, что усиление экспрессии rAd под действием агониста TLR не было обусловлено образованием комплекса rAd с агонистом или облегчением поступления rAd в клетки. Это было показано в опытах с отмыванием rAd перед внесением в культуру клеток агонистов TLR4 (Иммуномакс, LPS) или, наоборот, путем отмывания агониста TLR4 перед трансдукцией клеток rAd. В обоих вариантах эффект усиления экспрессии rAd не отличался от эффекта, наблюдаемого при одновременном добавлении к клеткам rAd и агониста TLR (рис. 7А,Б).

Совершенно неожиданным оказалось действие агониста TLR3, который, в отличие от агонистов TLR2, 4, 5, 7/8 и 9, вызывал не усиление, а угнетение продукции белка, кодируемого rAd-вектором. Ингибирующее действие TLR3 проявлялось при экспрессии rAd-SEAP и rAd-GFP (рис. 6А,Б).

Активация NF-kB, минуя TLR, тоже приводит к усилению экспрессии трансгена

Все TLR, кроме TLR3, передают внутриклеточный сигнал через адапторную молекулу MyD88,

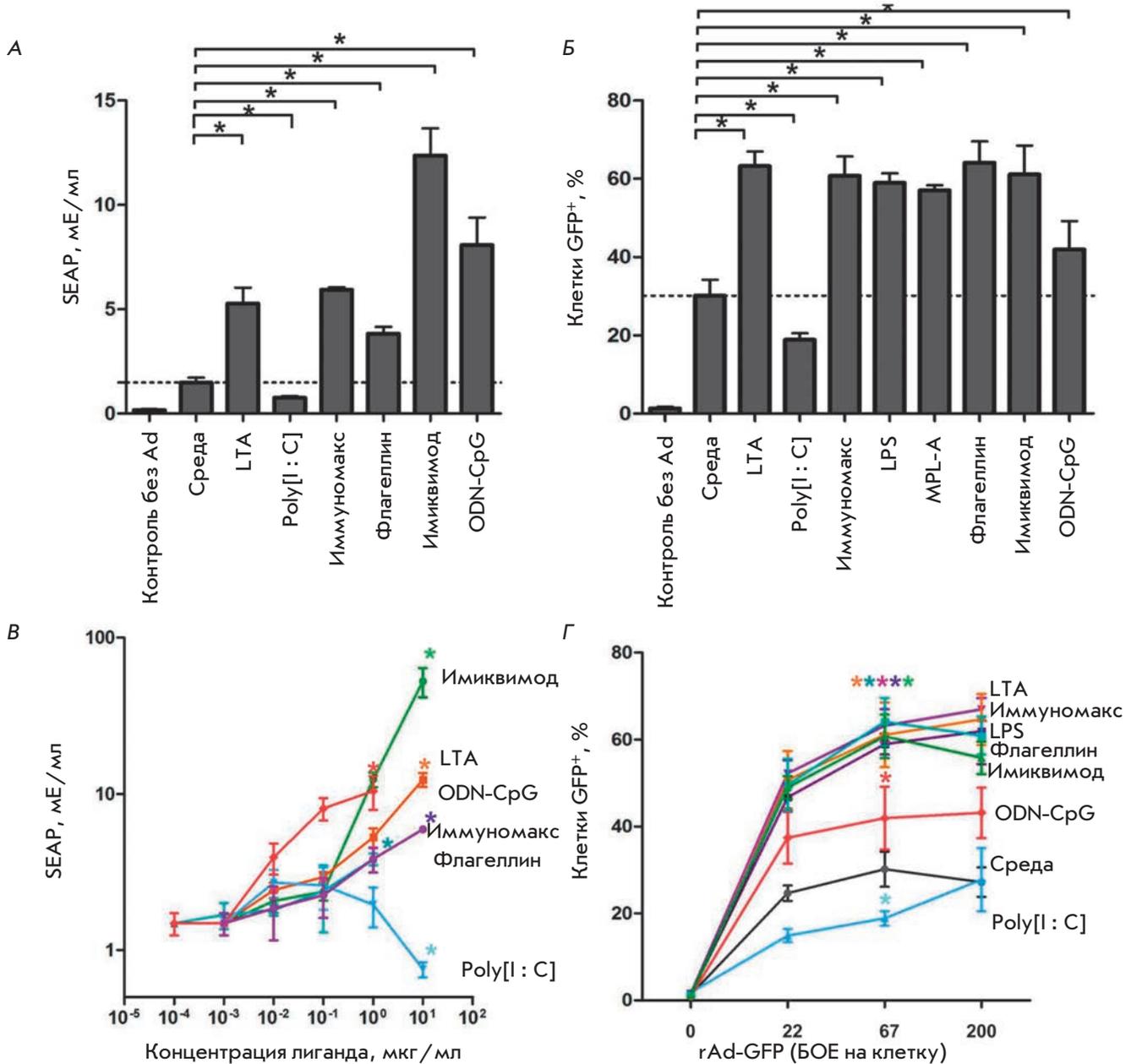


Рис. 6. Влияние агонистов Toll-подобных рецепторов на трансдукцию и экспрессию rAd-SEAP и rAd-GFP в макрофагах мыши. Макрофаги перитонеальной полости мыши трансдуцировали (А, В) Ad-SEAP 5×10^7 БОЕ/мл или (Б) Ad-GFP 5×10^7 БОЕ/мл, или (Г) Ad-GFP в различной концентрации, а затем инкубировали в течение 4 сут в присутствии агонистов различных TLR. По окончании инкубации определяли содержание SEAP в культуральной жидкости (А, В) или процент GFP-позитивных клеток (Б, Г). В экспериментах (А, Б, В, Г) использованы следующие лиганды: LTA (1 мкг/мл), Poly[I : C] (10 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), MPL-A (5 мкг/мл), флагеллин (1 мкг/мл), имиквимод (1 мкг/мл), ODN-CpG 1826 (10 нг/мл), Иммуномакс (10 мкг/мл). Изменение концентрации лигандов (В) отражено по оси абсцисс. Представлены средние значения и стандартные отклонения

что, в конечном счете, приводит к активации фактора NF-κB. Мы предположили, что усиление экспрессии трансгена агонистами TLR определяется активацией сигнальной оси MyD88 → NF-κB. Это

предположение было проверено двумя способами – блокированием передачи сигнала с TLR на MyD88 и активацией NF-κB в обход TLR. Передачу сигнала с TLR4 на MyD88 мы блокировали с помощью

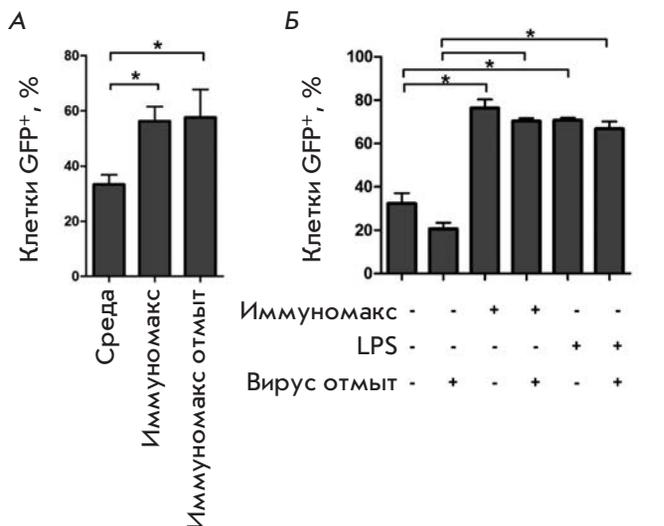


Рис. 7. Усиление экспрессии rAd-GFP при последовательном (раздельном) использовании rAd-GFP и агонистов TLR4. **А** – перитонеальные макрофаги (2×10^4 на лунку) инкубировали в полной культуральной среде в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) в течение 4 ч, затем клетки трижды отмывали PBS, после чего в культуры вносили rAd-GFP (70 БОЕ на клетку). Через 24 ч культивирования при 37°C в CO₂-инкубаторе культуральную жидкость заменяли на раствор Версена («ПанЭко») и культуры оставляли на 1 ч при 4°C, затем клетки смывали PBS с 0.5% БСА и анализировали содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II. **Б** – перитонеальные макрофаги (2×10^4 на лунку) инкубировали в течение 2 ч в полной культуральной среде с добавлением rAd-GFP (70 БОЕ на клетку), после чего часть лунок трижды отмывали PBS, а затем вносили полную культуральную среду с Иммуномаксом (10 мкг/мл) или LPS (3 мкг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. Через 24 ч клетки снимали раствором Версена и определяли содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II

специфического ингибитора CLI-095. Активацию NF-κB, минуя TLR, осуществляли с помощью цитокина TNF-α, который действует на NF-κB через рецепторы TNF.

Полученные данные представлены на рис. 8 и 9. Как и предполагалось, ингибитор CLI-095 отменяет вызванные Иммуномаксом или LPS эффекты усиления экспрессии rAd-GFP (рис. 8). Активация перитонеальных макрофагов рекомбинантным TNF-α (10 нг/мл) вызывала такое же усиление экспрессии SEAP и GFP (рис. 9), как и воздействие Иммуномаксом. Последнее означает, что активация TLR-путей не обязательна, достаточно активировать в клетках NF-κB, чтобы индуцировать усиленную экспрессию трансгенов в составе rAd.

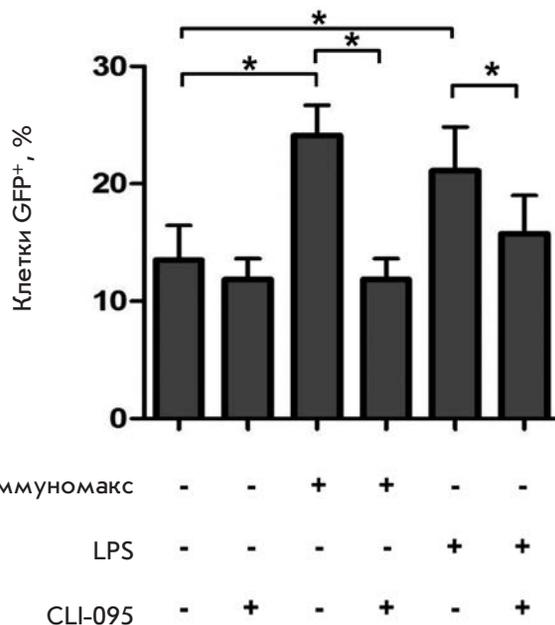


Рис. 8. Селективный ингибитор TLR4-сигнала (CLI-095) отменяет усиление экспрессии rAd-GFP, вызванное агонистами TLR4. Перитонеальные макрофаги инкубировали в течение 1 ч в полной культуральной среде с добавлением CLI-095 (1 мкг/мл) или без него, после чего в среду добавляли rAd-GFP (70 БОЕ на клетку) и Иммуномакс (10 мкг/мл) или LPS (3 мкг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. Через 24 ч клетки снимали раствором Версена и анализировали содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II

ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные нереплицирующиеся аденовирусные векторы трансдуцируют эпителиальные клетки, а также дендритные клетки и макрофаги. Клетки двух последних типов являются профессиональными антигенпредставляющими клетками, потому они представляют особый интерес при иммунизации rAd. Экспрессия кодируемых rAd целевых белков в антигенпредставляющих клетках определяет успех вакцинных препаратов на основе rAd. Для эффективной индукции клеточного и гуморального иммунного ответа на белковый антиген необходимо выполнение, как минимум, двух критических условий. Во-первых, на поверхности антигенпредставляющих клеток должна происходить экспрессия пептидных фрагментов белка-антигена в комплексе с молекулами MHC классов I и II. Во-вторых, на поверхности тех же клеток должны экспрессироваться коактиваторные молекулы CD80, CD86 и CD40, обеспечивающие активацию специфических к антигену Т-клеток

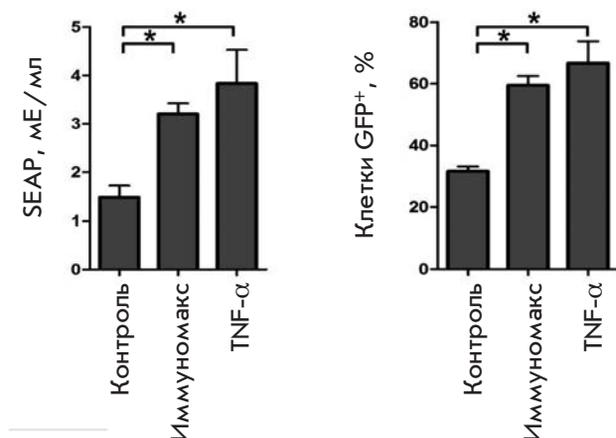


Рис 9. Цитокин TNF-α усиливает экспрессию белков GFP и SEAP в макрофагах, трансдуцированных rAd со вставкой генов GFP и SEAP. Перитонеальные макрофаги мыши трансдуцировали rAd-SEAP (5×10^7 БОЕ/мл) или rAd-GFP (5×10^7 БОЕ/мл), а затем инкубировали в течение 4 дней в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или TNF-α (10 нг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. По окончании инкубации определяли содержание SEAP в культуральной жидкости или процент GFP-позитивных клеток

при контакте с антигенпредставляющей клеткой. Первое условие выполняется, если целевой антиген производится дендритными клетками и макрофагами, трансдуцированными rAd. Для выполнения второго условия необходима активация дендритных клеток и макрофагов через рецепторы TLR или иным образом.

В нашей работе мы показали, что белки, кодируемые трансгенами в составе rAd-векторов, экспрессируются в дендритных клетках и макрофагах (рис. 1–3). Дополнительная активация антигенпредставляющих клеток с помощью агониста TLR4 приводит к усиленной экспрессии коактиваторных молекул CD80, CD86 и CD40. Кроме того, как показано в нашей работе, под влиянием агониста TLR4 происходит усиление экспрессии целевого белка (рис. 1–4). Усиленная продукция белка-антигена, наряду с экспрессией коактиваторных молекул CD80, CD86 и CD40, может способствовать повышению эффективности иммунных реакций, когда для иммунизации используется сочетание rAd и агониста TLR4. Ранее мы показали, что сочетанная иммунизация rAd-НА, кодирующим гемагглютинин вируса гриппа, с фармацевтическим агонистом TLR4 (Иммуномакс) позволяет повысить эффективность вакцинации против вирусов гриппа А и В [7].

Векторы rAd могут использоваться не только для вакцинации, но и для генной терапии. В этом случае введение в организм больного rAd со вставкой трансгена обеспечивает продукцию терапевтического белка, как минимум, в течение 2–3 недель. Показанная нами возможность усиления продукции белка, кодируемого геном, встроенным в состав rAd, путем дополнительного введения агониста TLR4 может быть важна для повышения эффективности генной терапии с помощью rAd. Возможно, что сочетание rAd с агонистом TLR4 позволит получить терапевтический белок в более высоких концентрациях, чем при использовании только rAd, или получать белок в нужной концентрации при введении меньшего количества rAd.

Молекулярная сигнализация через Toll-подобные рецепторы была предметом детального изучения в течение последних 15 лет. Результаты этих исследований привели к пониманию внутриклеточных сигнальных событий, индуцируемых воздействием лигандов TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8, TLR9 в клетках мыши и человека [13, 14]. Оказалось, что от TLR идут два типа сигнальных каскадов. Один начинается с адапторных молекул, в число которых обязательно входит MyD88, и заканчивается активным фактором NF-κB. Другой начинается с адапторных молекул, среди которых обязательно должен быть TRIF, и заканчивается факторами транскрипции семейства IRF, в частности IRF3.

Сигнальный путь MyD88 → NF-κB используется при воздействии агонистов на рецепторы TLR1/2, TLR2/6, TLR5, TLR7, TLR8 и TLR9. Сигнальный путь TRIF → IRF действует при активации TLR3. Отличительная особенность TLR4 – использование обоих сигнальных путей. Сразу после действия агониста TLR4 передает сигнал с внешней клеточной мембраны по пути MyD88 → NF-κB. Чуть позже, после эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов, TLR4 использует вторую сигнальную цепь TRIF → IRF.

В нашей работе обнаружено, что агонисты различных TLR стимулируют продукцию белков, ген которых встроен в rAd. Усиление экспрессии трансгена мы наблюдали при использовании агонистов TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/8 и TLR9 (рис. 6А,Б). Противоположным оказалось влияние агониста TLR3. При воздействии Poly[I : C] одновременно с трансдукцией дендритных клеток и макрофагов rAd-GFP или rAd-SEAP подавлялась продукция GFP и SEAP (рис. 6А,Б). Сравнивая внутриклеточные сигнальные пути, идущие от разных TLR, мы предположили, что активация NF-κB может отвечать за усиленную продукцию, а активация IRF лежит

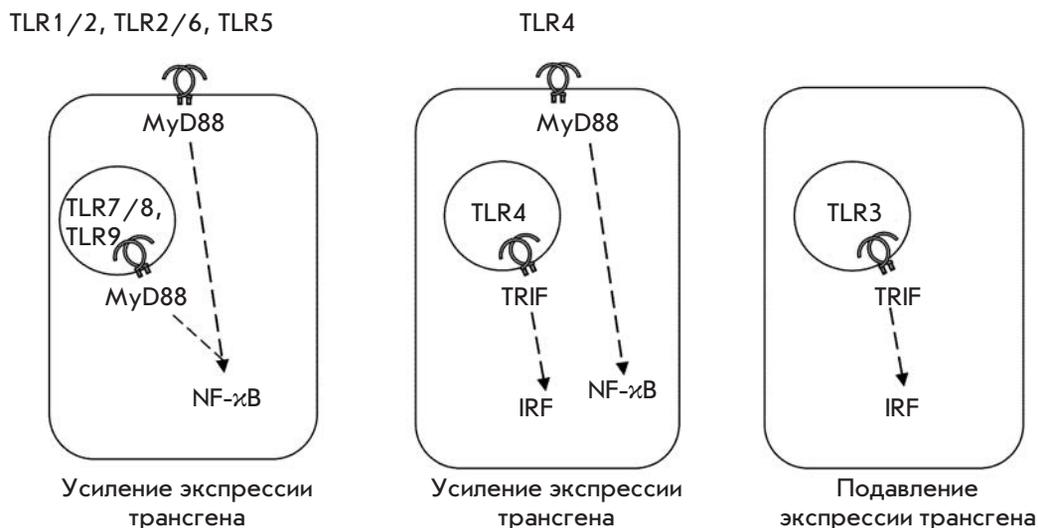


Рис. 10. Возможный механизм усиления или подавления агонистами различных TLR экспрессии белка, кодируемого трансгеном в составе аденовирусного вектора

в основе подавления продукции белка, кодируемого трансгеном в составе rAd.

Особый случай – агонисты TLR4. Поскольку при использовании агонистов TLR4 происходит усиление продукции белков, кодируемых rAd, мы предполагаем, что сигнальная ветвь MyD88 → NF-κB доминирует над сигнальной ветвью TRIF → IRF (рис. 10).

Предположение о стимулирующей роли сигнальной оси MyD88 → NF-κB отчасти подтверждается нашими результатами. CLI-095, селективный блокатор передачи сигнала с TLR4 на адапторную молекулу MyD88, отменяет повышение продукции белка, кодируемого rAd, под действием агонистов TLR4 (рис. 8). В свою очередь, активация NF-κB «в обход» TLR приводит к усиленной экспрессии трансгенов в составе rAd. Так, при активации клеток цитокином TNF-α одновременно с трансдукцией rAd-SEAP или rAd-GFP мы наблюдали повышение продукции SEAP и GFP соответственно (рис. 9). Известно, что сигналы TNF-α передаются через рецепторы TNFR1 и TNFR2. Внутриклеточный сигнальный путь заканчивается активацией NF-κB. Следовательно, активация NF-κB, минуя рецепторы TLR, также приводит к усилению экспрессии трансгена, что не доказывает, но говорит в пользу предположения о стимуляции продукции белка, кодируемого этим геном под действием NF-κB.

Использованные нами конструкции rAd-GFP, rAd-SEAP и rAd-HA содержали ген соответствующего белка под контролем реагирующего на NF-κB CMV-промотора с четырьмя сайтами, узнаваемыми NF-κB [15]. Вполне логично предположить, что дополнительная активация NF-κB агонистами TLR2,

TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 и TLR9 может усиливать транскрипцию генов, контролируемых CMV-промотором.

В принципе, TLR-сигнализация может влиять на продукцию белка, воздействуя на транскрипцию, трансляцию или другие важнейшие процессы в клетке. Точные механизмы, приводящие к усилению экспрессии трансгенов при активации TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 и подавлению продукции белка, кодируемого трансгеном в составе rAd, при активации TLR3, еще предстоит установить.

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы используются не только для иммунизации, но и в генной терапии. Описанные в нашей работе эффекты агонистов TLR на экспрессию трансгенов в составе аденовирусных векторов намекают перспективное направление – разработку способов направленной регуляции экспрессии трансгенов в организме. В идеале могут быть разработаны методы, которые позволят после введения трансгена в организм больного усиливать или подавлять экспрессию его белка-продукта в зависимости от поставленной задачи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе изучено влияние агонистов Toll-подобных рецепторов на эффективность трансдукции и экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках животных и человека. Установлено, что агонисты TLR2, 4, 5, 7, 8 и 9 значительно усиливают продукцию трансгенного белка в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой соответствующего трансгена. Эффект усиления наблюдается в дендритных клетках и макрофагах, экспрессирующих цитоплазма-

тический (GFP), мембранный (HA) или секреторный (SEAP) белки. В экспериментах на лабораторных мышцах показано, что усиление экспрессии целевого белка с помощью фармацевтического агониста TLR4 происходит и в организме животного. В отличие от агонистов других TLR, агонист TLR3 подавляет продукцию белка (GFP или SEAP) в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой соответствующего трансгена.

Молекулярные механизмы усиления и подавления экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках, активированных различными агонистами TLR, еще предстоит изучить. В представленной работе приведены данные в пользу предположения, согласно которому усиление экспрессии rAd происходит в результате активации фактора транскрипции NF- κ B, а подавление обусловлено активацией факторов транскрипции серии IRF. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arama C., Assefaw-Redda Y., Rodriguez A., Fernández C., Corradin G., Kaufmann S.H., Reece S.T., Troye-Blomberg M. // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 27. P. 4040–4045.
2. Hoft D.F., Blazevic A., Stanley J., Landry B., Sizemore D., Kramegan E., Gearhart J., Scott A., Kik S., Pau M.G., et al. // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 12. P. 2098–2108.
3. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. № 1. P. 85–94.
4. Sharma A., Tandon M., Bangari D.S., Mittal S.K. // *Curr. Drug Ther.* 2009. V. 4. № 2. P. 117–138.
5. INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy-introgen, RPR/INGN 201. // *Drugs R D*. 2007. V. 8. № 3. P. 176–187.
6. Pearson S., Jia H., Kandachi K. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 3–4.
7. Атауллаханов Р.Р., Шмаров М.М., Седова Е.С., Логунов Д.Ю., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. // Патент № WO2013129961 A1 РФ, C07K16/10, A61P31/16, C12N15/44, C07K14/11, A61K39/145. 2012.
8. Shmarov M.M., Sedova E.S., Verkhovskaya L.V., Rudneva I.A., Bogacheva E.A., Barykova Y.A., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Tutykhina I.L., Logunov D.Y., et al. // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. № 1. P. 111–118.
9. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастер-нак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И., Стеценко О.Н. // *Иммунология*. 2005. № 2. С. 111–120.
10. Мельникова Т.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. // Заявка на патент RU 2013151824, приоритет 21.11.2013.
11. Graham F.L., Prevec L. // *Methods in Mol. Biol.* 1991. V. 7. P. 109–127.
12. Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B.R. // *Gene*. 1988. V. 66. № 1. P. 1–10.
13. Newton K., Dixit V.M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 3. a006049. P. 1–19. doi: 10.1101/cshperspect.a006049
14. Lim K.H., Staudt L.M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 1. a011247. doi: 10.1101/cshperspect.a011247.
15. Lee Y., Sohn W.J., Kim D.S., Kwon H.J. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. № 6. P. 1094–1105.

УДК 577.352.465

Белок STIM1 активирует депо-управляемые кальциевые каналы в клетках-моделях болезни Хантингтона

В. А. Вигонт, О. А. Зимина, Л. Н. Глушанкова, Ю. А. Колобкова, М. А. Рязанцева, Г. Н. Можаяева, Е. В. Казначеева*

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

*E-mail: evkzn@incras.ru

Поступила в редакцию 22.05.2014

РЕФЕРАТ Ранее нами было показано, что экспрессия полноразмерного мутантного хантингтина в клетках нейробластомы человека (SK-N-SH) приводит к аномальному увеличению входа кальция через депо-управляемые каналы. В данной работе показано, что для получения адекватной модели болезни Хантингтона достаточно экспрессии N-концевого фрагмента мутантного хантингтина (Htt138Q-1exon). Установлено, что экспрессия Htt138Q-1exon вызывает значительное увеличение депо-управляемого кальциевого входа в клетках SK-N-SH, причем для этого необходим белок STIM1, являющийся сенсором кальция в просвете эндоплазматического ретикулума. Показано также, что депо-управляемый вход кальция в клетках, экспрессирующих Htt138Q-1exon, опосредуется, по меньшей мере, двумя типами каналов с различными потенциалами реверсии. Полученные результаты позволяют рассматривать белки, отвечающие за активацию и поддержание депо-управляемого входа кальция, в качестве новых перспективных мишеней в терапии нейродегенеративных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Хантингтона, кальций, нейродегенерация, SOC, STIM1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БХ – болезнь Хантингтона; ВАХ – вольт-амперная характеристика; ПМ – плазматическая мембрана; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Htt138Q-1exon – продукт, кодируемый первым экзоном мутантного белка хантингтина, или клетки, экспрессирующие этот продукт; Htt138Q-1exon STIM1(-) – клетки Htt138Q-1exon с подавленной экспрессией белка STIM1; IP₃ – инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP₃R1 – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата 1; GFP – зеленый флуоресцентный белок; SK-N-SH – клетки нейробластомы человека; STIM1 – стромальная взаимодействующая молекула 1 (STromal Interaction Molecule 1).

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения кальциевой сигнализации наблюдаются при многих заболеваниях, в частности, дестабилизация работы кальциевых ионных каналов различного типа связана с такими патологиями, как, например, сахарный диабет [1] или боковой амиотрофический склероз [2]. Во многих публикациях отмечается вовлеченность нарушенной кальциевой сигнализации в процессы нейродегенерации [3, 4].

Болезнь Хантингтона (БХ) – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, обусловленное увеличением числа кодирующих глутамин повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового повтора не должна превышать 35 остатков, в то время как при заболевании длина таких повторов достигает 90 и более

остатков глутамина [5]. В первую очередь, при БХ поражаются нейроны стриатума.

В клетке хантингтин выполняет функции адаптерного белка, т.е. обеспечивает колокализацию взаимодействующих с ним белков, помогая им выполнять свои функции. С хантингтином взаимодействует множество белков с самыми разнообразными функциями – от везикулярного транспорта и эндоцитоза до регуляции транскрипции и апоптоза [6].

Одна из токсических функций мутантного хантингтина – дестабилизация кальциевой сигнализации. Ранее было показано, что мутантный хантингтин способен прямо связываться с C-концом рецептора инозитол-1,4,5-трисфосфата первого типа (IP₃R1). Такое связывание увеличивает чувствительность IP₃R1 к своему лиганду, что может приводить к активации рецептора и опустошению внутриклеточных

кальциевых депо в ответ на базальные концентрации IP_3 в цитозоле [7]. Показано также, что экспрессия мутантного хантингина вызывает усиление функции NR2B-содержащего рецептора NMDA [8] и воздействует на потенциал-зависимые кальциевые каналы [9]. Все перечисленные пути ведут к повышению концентрации ионов кальция в цитозоле и, как следствие, к аномальному накоплению кальция в митохондриях [10, 11], активации кальпаинов [12], патологическому запуску кальций-зависимых сигнальных путей, апоптотической активности и дегенерации нейронов.

Ранее мы наблюдали аномальную активацию депо-управляемых кальциевых каналов в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, в которых для моделирования БХ экспрессировали полноразмерный мутантный белок хантингин [13]. Помимо этого мы показали, что депо-управляемый вход кальция может рассматриваться как потенциальная мишень для терапевтического воздействия при разработке новых подходов к терапии БХ. Также флуоресцентными методами было показано, что депо-управляемый вход кальция гиперактивирован в нейронах стриатума, выделенных из мышей YAC128, используемых в качестве модели БХ [14].

Считается, что БХ ассоциирована с отщеплением от мутантного хантингина N-концевого фрагмента, который кодируется первым экзоном и содержит полиглутаминовый тракт. Этот процесс сопровождается накоплением отщепленного фрагмента в ядре, в то время как хантингин дикого типа локализован в основном в цитозоле [15, 16]. Показано также, что для увеличения чувствительности IP_3R1 к IP_3 достаточно экспрессии лишь N-концевого фрагмента патогенного хантингина [7].

В связи с этим целью нашей работы стало изучение изменений работы депо-управляемых кальциевых каналов в клетках SK-N-SH, экспрессирующих первый экзон гена патологического хантингина со 138 остатками глутамина в тракте (Htt138Q-1exon), а также исследование роли белка STIM1 в активации этих каналов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика (80 мкг/мл гентамицина). За 2–3 дня до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм). Для лучшей адгезии клеток стекла покрывали 0.01% раствором полилизина.

Инфицирование клеток, трансфекция и РНК-интерференция

Челночный вектор, кодирующий N-концевой фрагмент белка Htt138Q-1exon (270 аминокислот), конъюгированный с HA-tag, пакующий вектор HIV-1 8.9 и VSVG плазмиды, кодирующие поверхностные гликопротеины вирусной частицы, были любезно предоставлены проф. И.Б. Безпрозванным (UT Southwestern Medical Center, США). Вирус Lenti-Htt138Q-1exon создан путем котрансфекции челночного вектора с пакующим вектором HIV-1 8.9 ($\Delta 8.9$) и VSVG плазмидами, кодирующими поверхностные гликопротеины в пакующую клеточную линию HEK293T. После добавления раствора для трансфекции в среду чашки Петри с клетками инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37°C, а затем 72 ч при 32°C. За это время упакованные вирусы выделялись клетками в среду. По истечении срока инкубации среду с вирусами отфильтровывали (\varnothing 0.45 мкм), немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Для определения титра вируса использовали метод иммуноокрашивания с антителами к HA-tag. Долю инфицированных клеток от числа всех клеток на стекле определяли визуально с помощью микроскопа Pascal. В результате проверки эффективности инфицирования по измерению доли светящихся клеток выбирали то соотношение среды с вирусом и среды культивирования, при котором минимальная эффективность составляла 90%.

Инфицирование клеток проводили на следующие сутки после посева на стекла. К клеткам добавляли культуральную среду с количеством лентивируса, обеспечивающим минимальную эффективность трансфекции 90%.

В контрольных экспериментах клетки инфицировали пустым экспрессионным вектором (контрольный вектор) (SIGMA, США).

В экспериментах с подавлением экспрессии STIM1 в дополнение к инфицированию клеток Lenti-Htt138Q-1exon использовали котрансфекцию плазмидой, кодирующей siРНК против STIM1 (SIGMA, США), и плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), в соотношении 3 : 1.

В контрольных экспериментах использовали котрансфекцию плазмиды с siРНК, не имеющей специфической мишени (контрольная siРНК) (SIGMA, США), и плазмиды, кодирующей GFP, в соотношении 3 : 1.

Электрофорез и иммуноблотинг

Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 50 мм. После трансфекции клетки лизировали в буферном растворе следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1% NP40

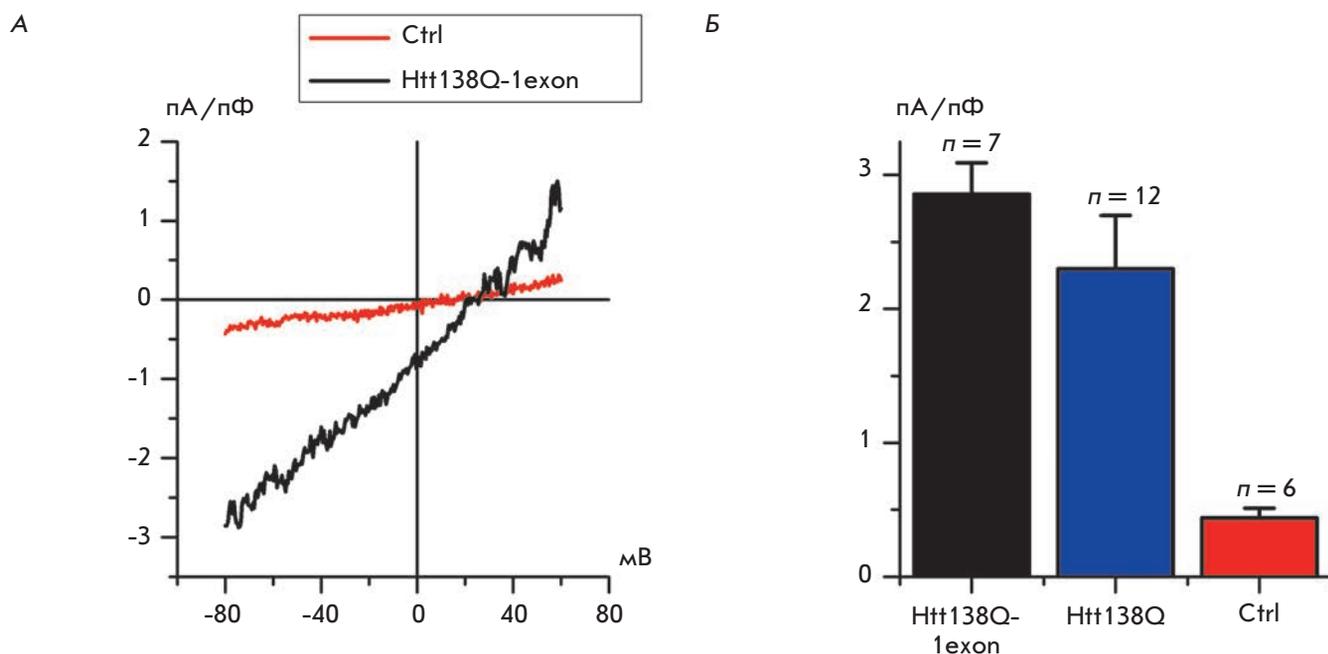


Рис. 1. Влияние лентивирусной экспрессии Htt138Q-1exon на уровень депо-управляемых токов в клетках SK-N-SH. А – средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках SK-N-SH с лентивирусной экспрессией Htt138Q-1exon (черная линия), в контрольных клетках SK-N-SH с лентивирусной экспрессией контрольного вектора (красная линия). Количество экспериментов указано на панели (Б). Б – стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, трансфицированных полноразмерным Htt138Q (синяя заливка); с лентивирусной экспрессией Htt138Q-1exon (черная заливка), в контрольных клетках SK-N-SH (красная заливка). Уровень статистической значимости отличающихся результатов составляет $p < 0.05$

(Nonidet P40, неионный детергент нонилфенилполиэтиленгликоль), 2 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз, фенилметансульфонил-фторид) с добавлением ингибиторов протеаз (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Германия). Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8% полиакриламидном геле в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием моноклональных антител против STIM1 (BD Bioscience, США) в разведении 1 : 250. В качестве вторых антител брали антитела козы против константной части иммуноглобулинов мыши (1 : 30000). Белки на иммуноблотах выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate (PIERCE, США). Опыты повторяли как минимум 3 раза, используя различные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против α -тубулина в разведении 1 : 1000 (SIGMA, США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью стандартной программы сравнения интенсивности окрашивания сканированного иммуноблота.

Электрофизиологические измерения

Для регистрации ионных токов использовали метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) в условиях регистрации тока от целой клетки (whole cell) [17]. Все измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектродов составляло 5–15 МОм. Последовательное сопротивление не компенсировали. Усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель двухполюсным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц) сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L305 (L-Card, Россия). При записях интегральных токов клетки потенциал-мембраны поддерживали на уровне -40 мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до -100 мВ (на 30 мс), а затем постепенно с постоянной скоростью 1 мВ/мс его величину изменяли до $+100$ мВ. Шаг измерения составлял 0.5 мВ. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки (10–30 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы.

Растворы

В измерениях, выполненных в конфигурации whole cell, раствор регистрирующей пипетки содержал (в mM): 135 CsCl, 10 EGTA-Cs, 30 Hepes-Cs, 4.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 4 Na-ATP, 0.4 Na₂-GTP (pCa7), pH 7.3. Внеклеточный раствор содержал (в mM): 130 NMDG-Asp, 10 BaCl₂, 20 Hepes-Cs, 0.01 нифедипина, pH 7.3.

Ионы бария были выбраны в качестве носителя тока для предотвращения кальций-зависимой инактивации. Нифедипин добавляли в раствор экспериментальной камеры для исключения возможного вклада во входящий интегральный ток потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа.

Для активации депо-управляемых токов во внеклеточный раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина, который подавали к объекту путем перфузии экспериментальной камеры. Время замены раствора в камере составляло менее 1 с.

Обсчет

Обсчет электрофизиологических данных и линеаризация полученных вольт-амперных характеристик проводили с помощью программного пакета OriginPro 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы смоделировать БХ, клетки нейробластомы человека SK-N-SH инфицировали лентивирусом, несущим конструкцию, кодирующую продукт первого экзона гена белка хантингтина с полиглутаминовым трактом из 138 остатков глутамина (Htt138Q-lexon).

Для активации депо-управляемых кальциевых каналов в раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина – необратимого блокатора всех изоформ SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), функционирующих в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) в качестве кальциевых насосов и отвечающих за выкачивание ионов кальция из цитозоля в просвет ЭР. Поскольку считается, что аппликация тапсигаргина ведет к пассивному опустошению депо и не влияет на другие клеточные сигнальные пути, зарегистрированный ток можно приписать работе исключительно депо-управляемых каналов.

Анализ электрофизиологических экспериментов, в которых регистрировались интегральные кальциевые токи (patch clamp в конфигурации whole cell) в ответ на аппликацию 1 мкМ тапсигаргина, показал, что в клетках, экспрессирующих первый экзон мутантного хантингтина, депо-управляемый вход кальция был значительно выше, чем в контрольных клетках (ctrl), экспрессирующих пустой контрольный вектор (рис. 1А). Амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q-lexon составила 2.86 ± 0.24 пА/пФ, в то время как в контрольных

клетках амплитуда аналогичных токов была лишь 0.44 ± 0.07 пА/пФ.

Проведя сравнение с данными, полученными нами ранее на клетках SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный мутантный хантингтин [13, 14], можно заключить, что экспрессия полноразмерного белка Htt138Q и продукта первого экзона Htt138Q-lexon практически одинаково влияет на уровень депо-управляемого входа кальция в клетки SK-N-SH (рис. 1Б). В клетках SK-N-SH, экспрессирующих N-концевой фрагмент патогенного хантингтина, амплитуда депо-управляемого входа кальция составляла 2.86 ± 0.24 пА/пФ, в условиях же экспрессии полноразмерного патогенного хантингтина наблюдаемая амплитуда составляла 2.30 ± 0.40 пА/пФ (рис. 1Б). Небольшое отличие в амплитудах депо-управляемого входа кальция в различных моделях БХ на клетках SK-N-SH статистически незначимо (для $p < 0.05$).

Таким образом, мы показали, что экспрессия N-концевого фрагмента мутантного хантингтина в клетках SK-N-SH представляет собой адекватную модель для исследования нарушений депо-управляемого входа кальция при БХ.

Следующей задачей данного исследования стало изучение роли белка STIM1 в активации депо-управляемых каналов в лентивирусной модели БХ.

STIM1 – интегральный белок мембран ЭР и плазматической мембраны (ПМ) с единственным трансмембранным доменом. Считается, что в основном STIM1 локализован в мембранах ЭР, и только порядка 15–25% STIM1 локализовано на ПМ клеток [18].

В клетке STIM1 выступает в роли кальциевого сенсора в люменальном пространстве ЭР и активатора депо-управляемых каналов ПМ [18]. В норме, при заполненном состоянии клеточного депо, белок STIM1 в мембране ЭР находится в неолигомеризованном состоянии. Опустошение кальциевого депо вызывает ряд конформационных изменений, вследствие которых происходит кластеризация STIM1 и его транспорт в puncta-область, прилежащую к ПМ [18]. Наличие в C-концевой области белка STIM1 богатого пролином домена предполагает возможность белок-белкового взаимодействия между отдельными молекулами STIM1, а также взаимодействия с другими белками. Причем локализация STIM1 в мембранах ЭР, расположенных в непосредственной близости от ПМ, делает возможным прямое взаимодействие STIM1 в мембране ЭР с белками ПМ.

В качестве белков, взаимодействующих с эндоплазматическим STIM1, можно выделить различные белки-каналоформеры, а также плазматический пул белка STIM1. Показано, что STIM1 взаимодействует с белками, отвечающими за депо-управляемый каль-

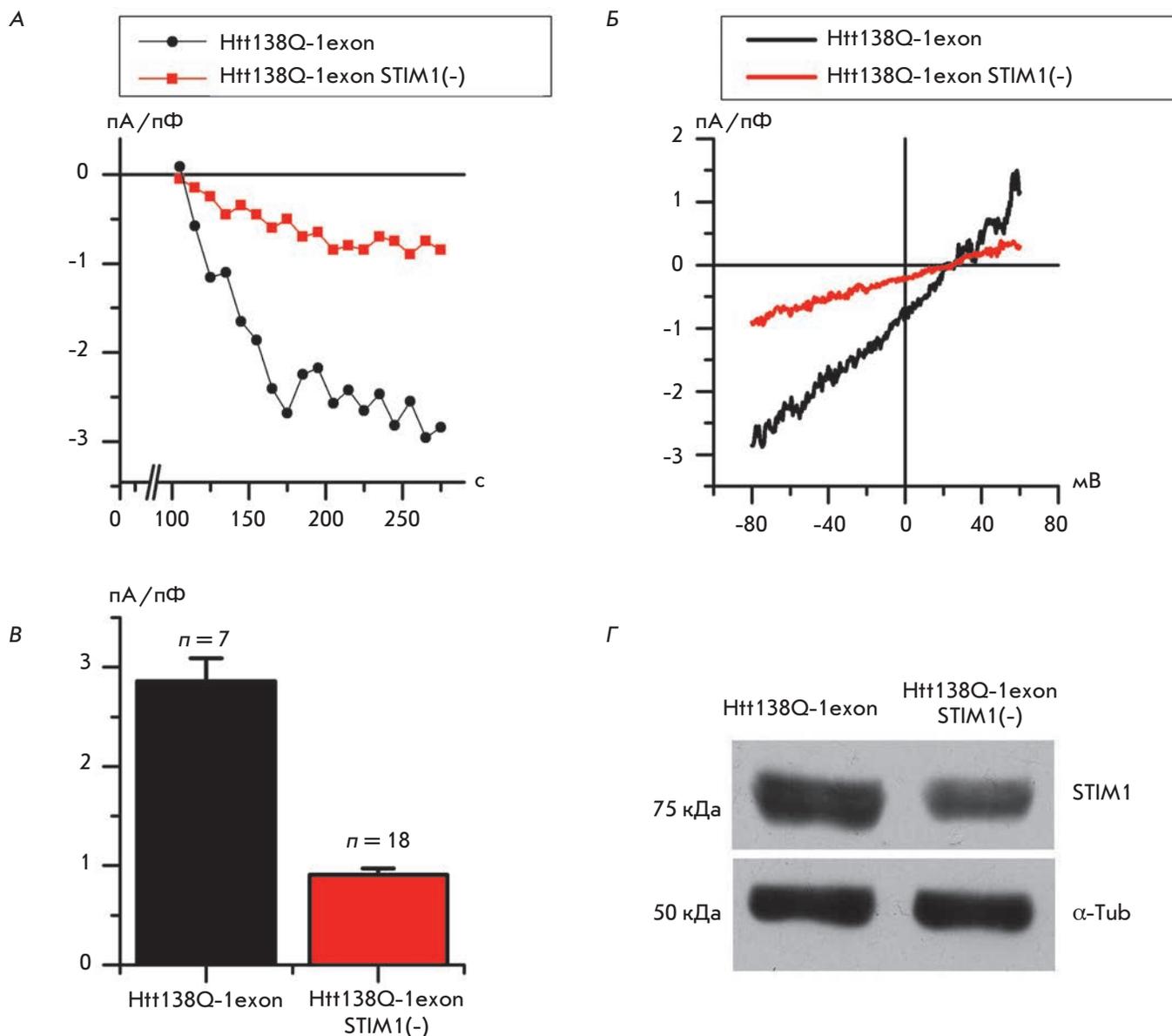


Рис. 2. Влияние супрессии STIM1 на депо-управляемые токи кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon. **А** – развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина при потенциале -80 мВ в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP (Htt138Q-1exon) (черные круги); трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красные квадраты); представлены данные двух репрезентативных опытов. **Б** – средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP (Htt138Q-1exon) (черная линия); трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красная линия). Количество опытов указано на панели (В). **В** – стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q-1exon, экспрессирующих GFP (Htt138Q-1exon) (черная заливка); экспрессирующих GFP и siРНК для супрессии STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красная заливка). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$. **Г** – иммуноблот, показывающий уровень экспрессии STIM1 в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP; и в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-))

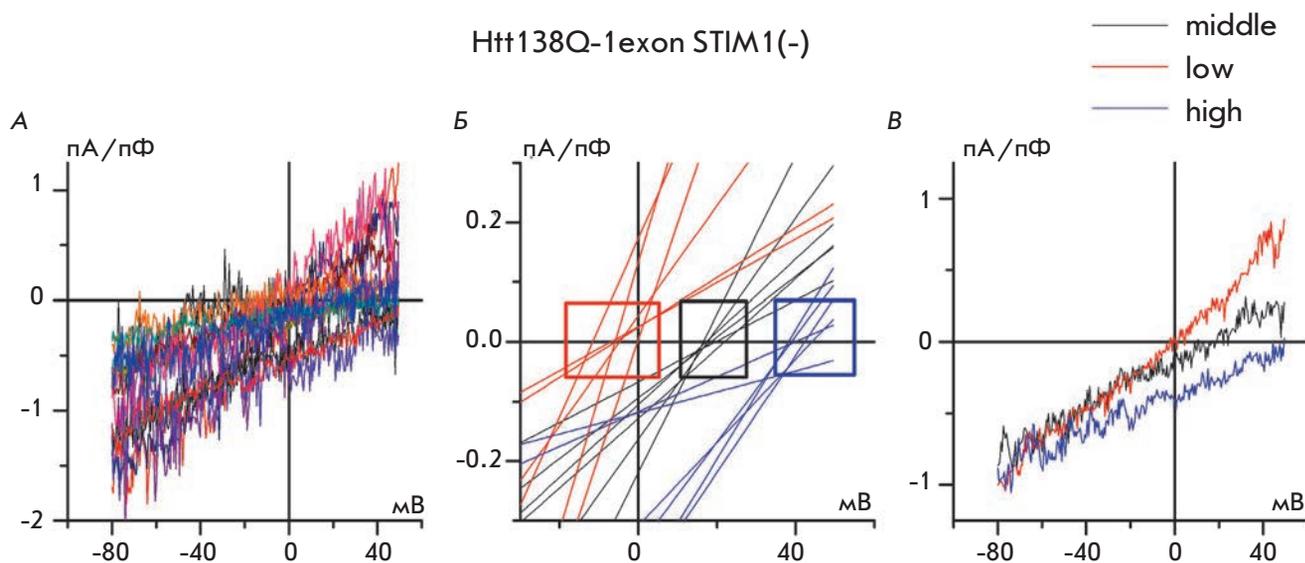


Рис. 3. Депо-управляемые токи в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon с подавленной экспрессией белка STIM1. **А** — усредненные ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (каждая цветная линия представляет собой отдельный эксперимент). **Б** — фрагменты линейаризаций ВАХ усредненных токов, представленных на панели (А) с низкими (красные линии), средними (черные линии) и высокими (синие линии) потенциалами реверсии. **В** — средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1: для токов с низким потенциалом реверсии (low) (красная линия); для токов со средним потенциалом реверсии (middle) (черная линия); для токов с высоким потенциалом реверсии (high) (синяя линия)

циевый вход в различных типах клеток: белками семейства TRPC [19] и с белком Orail [20].

Экспрессия STIM1 в клетках Htt138Q-1exon была подавлена с помощью малых интерферирующих РНК. Эффективность супрессии была подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 2Г).

Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что супрессия STIM1 приводит к выраженному уменьшению амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов с 2.86 ± 0.24 пА/пФ в клетках Htt138Q-1exon до 0.91 ± 0.07 пА/пФ в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) (рис. 2А,Б,В). Таким образом, можно сделать вывод, что белок STIM1 является важным звеном в активации депо-управляемого ответа в клетках Htt138Q-1exon.

Потенциал реверсии усредненного тока через депо-управляемые каналы в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) не отличался от потенциала реверсии усредненного тока в клетках Htt138Q-1exon (рис. 2Б). Однако при одновременном построении на одном графике вольт-амперных характеристик (ВАХ) отдельных экспериментов оказалось, что депо-управляемые токи в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) об-

ладают широким спектром различных потенциалов реверсии, что говорит о разной селективности каналов, опосредующих депо-управляемый ток (рис. 3А). Детальный анализ отдельных ВАХ зарегистрированных депо-управляемых токов в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-), а также их линейаризации показал, что потенциалы реверсии этих токов распадаются на три различные группы (рис. 3Б,В). Часть ВАХ обладали низкими потенциалами реверсии – не более 5 мВ, вторая группа обладала средними потенциалами реверсии около 20 мВ и, наконец, третья группа имела высокие потенциалы реверсии – более 35 мВ. Таким образом, становится понятно, что в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) за депо-управляемый вход кальция отвечает более одного типа депо-управляемых каналов с различной селективностью для Ca^{2+} . При этом амплитуды токов с высокими, средними и низкими потенциалами реверсии практически не отличались друг от друга при потенциале -80 мВ (рис. 3Б) и составляли 0.88 ± 0.20 , 0.87 ± 0.17 и 1.00 ± 0.28 пА/пФ соответственно.

Одной из гипотез, объясняющих подобные наблюдения, может стать предположение о том, что в клет-

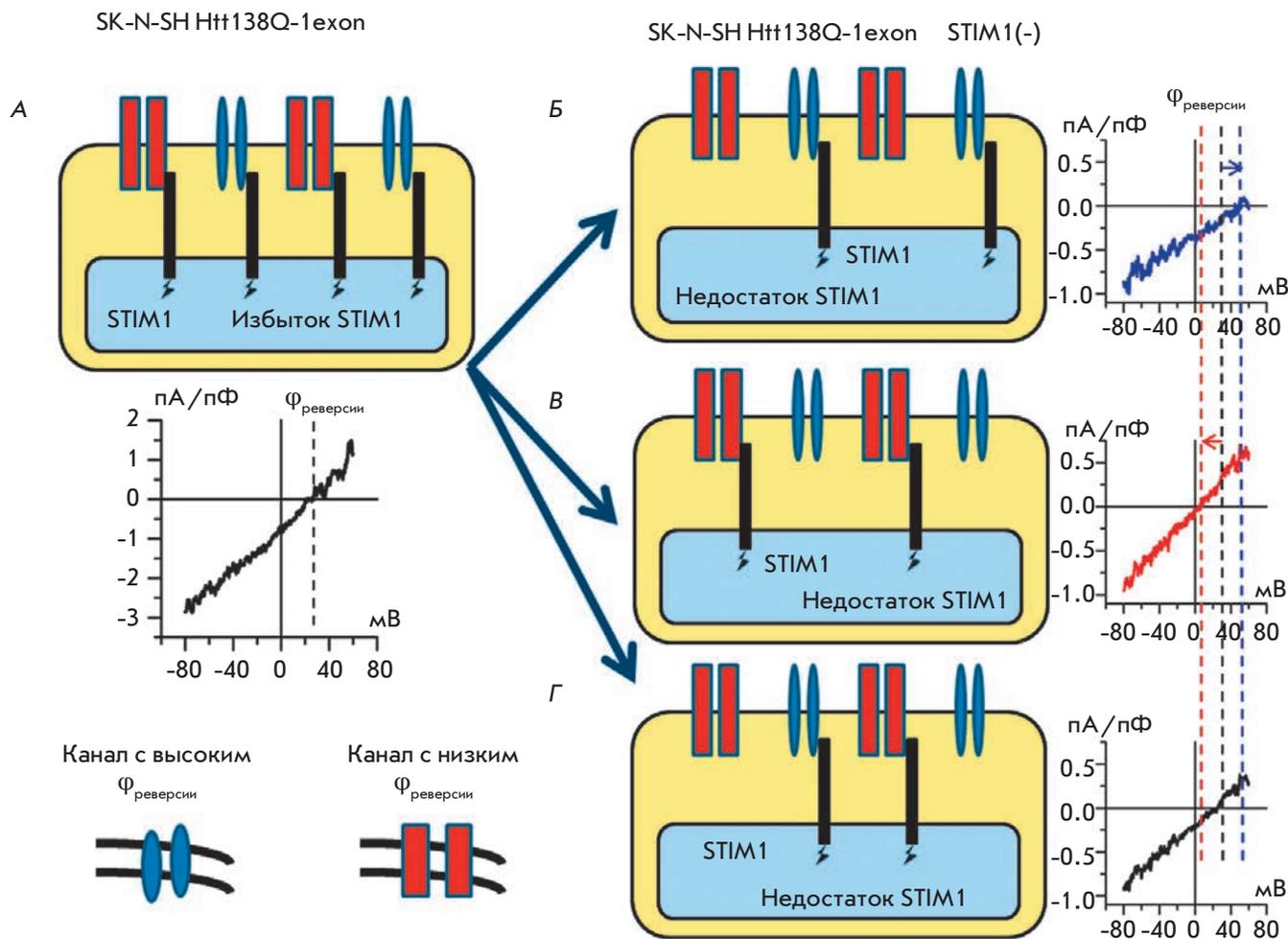


Рис. 4. Схема возможного пути активации депо-управляемых каналов с различными потенциалами реверсии в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon STIM1(-). А – в условиях не лимитированного количества белка STIM1 может происходить активация всех типов каналов, что дает среднюю ВАХ токов со средним значением потенциала реверсии. При недостатке белка STIM1 может происходить преимущественная активация одного из типов депо-управляемых каналов: с высоким потенциалом реверсии (Б) или с низким потенциалом реверсии (В). Также может происходить эквивалентная активация обоих типов каналов (Г). Каналы с высоким потенциалом реверсии представлены синими овалами и синей линией на графике ВАХ. Каналы с низким потенциалом реверсии представлены красными прямоугольниками и красной линией на графике ВАХ. Активация обоих типов каналов показана черной линией на графиках ВАХ. Потенциалы реверсии отмечены пунктирами соответствующего цвета

ках Htt138Q-1exon существуют два различных типа каналов, управляемых по депо-зависимому механизму, со сходными амплитудами при потенциале -80 мВ, но различающиеся по селективности. В таком случае, когда в клетках Htt138Q-1exon активируются тапсигаргин-индуцированные токи, ВАХ интегральных токов представляет собой суперпозицию двух типов активированных депо-управляемых каналов (рис. 2Б). Пока в клетках Htt138Q-1exon достаточно белка STIM1, отвечающего за активацию депо-управляемого входа, различные по селективности каналы активи-

руются приблизительно в одинаковой мере, что дает нам усредненную ВАХ с потенциалом реверсии, лежащим примерно посередине между потенциалами реверсии каждого из каналов (рис. 2Б, 4А). Когда же мы имеем дело с супрессией белка STIM1 в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-), то из-за недостатка STIM1 равновесие может смещаться в сторону преимущественной активации депо-управляемых каналов с высоким (рис. 4Б) или низким (рис. 4В) потенциалом реверсии. Также возможен вариант, при котором даже в условиях недостатка STIM1 будут активированы

каналы с различными потенциалами реверсии в приблизительно одинаковом количестве (рис. 4Г), что объясняют эксперименты на клетках Htt138Q-lexon STIM1(-), в которых наблюдались средние значения потенциала реверсии.

Разумеется, это лишь одно из возможных объяснений, и картина происходящего может быть значительно сложнее описанной. Так депо-управляемые токи в клетках Htt138Q-lexon могут представлять собой суперпозицию не двух, а трех или более каналов. В частности, в ранее опубликованных работах в клетках эмбрионального почечного эпителия человека (клеточная линия НЕК293) нами показано наличие четырех типов каналов с абсолютно различными биофизическими свойствами, способных активироваться по депо-зависимому механизму [21]. Аналогичные данные получены нами на клетках эпидермоидной карциномы человека А431 [22–24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в представленной работе мы показали, что экспрессия N-концевого фрагмента мутантного белка хантингтина позволяет эффективно смоделировать ранее описанные изменения депо-управляемого кальциевого входа в клетках нейроblastомы человека. Также мы установили, что активация депо-управляемых кальциевых каналов в клетках SK-N-SH требует присутствия кальциевого сенсора, белка STIM1. Кроме того, можно говорить о том, что в клетках SK-N-SH, моделирующих БХ, за депо-управляемый вход кальция отвечают, по меньшей мере, два различных типа каналов. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00720 (ВВ, ЮК, МР, ЕК)), грантами РФФИ, программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантом Era.NetRUS, стипендией Президента РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Graham S., Yuan J.P., Ma R. // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2012. V. 237. № 2. P. 111–118.
- Pieri M., Caioli S., Canu N., Mercuri N.B., Guatteo E., Zona C. // Exp. Neurol. 2012. V. 247. P. 349–358.
- Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. // IUBMB Life. 2008. V. 60. № 9. P. 575–590.
- Bezprozvanny I. // Trends Mol. Med. 2009. V. 15. № 3. P. 89–100.
- Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., Richardson E.P. Jr. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1985. V. 44. № 6. P. 559–577.
- Harjes P., Wanker E.E. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. № 8. P. 425–433.
- Tang T.S., Tu H., Chan E.Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // Neuron. 2003. V. 39. № 2. P. 227–239.
- Zeron M.M., Hansson O., Chen N., Wellington C.L., Leavitt B.R., Brundin P., Hayden M.R., Raymond L.A. // Neuron. 2002. V. 33. № 6. P. 849–860.
- Kaltenbach L.S., Romero E., Becklin R.R., Chettier R., Bell R., Phansalkar A., Strand A., Torcassi C., Savage J., Hurlburt A., et al. // PLOS Genet. 2007. V. 3. № 5. E82.
- Bossy-Wetzel E., Petrilli A., Knott A.B. // Trends Neurosci. 2008. V. 31. № 12. P. 609–616.
- Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // Nat. Neurosci. 2002. V. 5. № 8. P. 731–736.
- Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J. // Mol. Neurobiol. 2008. V. 38. № 1. P. 78–100.
- Глушанкова Л.Н., Зими́на О.А., Вигонт В.А., Можаяева Г.Н., Безпрозванный И.Б., Казначеева Е.В. // ДАН. 2010. Т. 433. № 6. С. 842–845.
- Wu J., Shih H.-P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Ahlijanian M., et al. // Chem. Biol. 2011. V. 18. № 6. P. 777–793.
- Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L., Bates G.P. // Cell. 1997. V. 90. № 3. P. 537–548.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. // Science. 1997. V. 277. № 5334. P. 1990–1993.
- Hamill O.P., Sakmann B. // Nature. 1981. V. 294. № 5840. P. 462–464.
- Dziadek M.A., Johnstone L.S. // Cell Calcium. 2007. V. 42. № 2. P. 123–132.
- Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. // Nat. Cell. Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 636–645.
- Peinelt C., Vig M., Koomoa D.L., Beck A., Nadler M.J., Koblan-Huberson M., Lis A., Fleig A., Penner R., Kinet J.P. // Nat. Cell. Biol. 2006. V. 8. № 7. P. 771–773.
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., Glushankova L., Nikolaev A., Wang Z., Kaznacheeva E., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 17. P. 16790–16797.
- Kaznacheeva E., Glushankova L., Bugaj V., Zimina O., Skopin A., Alexeenko V., Tsiokas L., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662.
- Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., Kaznacheeva E., Wang Z., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Gen. Physiol. 2003. V. 122. № 1. P. 81–94.
- Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 1. P. 148–153.

УДК 577.336; 577.112.7

Специфическая визуализация опухолевых клеток с помощью антистоксовых нанофосфоров

Е. А. Гребеник^{1*}, А. Н. Генералова¹, А. В. Нечаев², Е. В. Хайдуков³, К. Е. Миронова¹,
О. А. Стрёмовский¹, Е. Н. Лебеденко¹, А. В. Звягин^{1,4,5}, С. М. Деев^{1,4}

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

²Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

³Институт лазерных и информационных технологий РАН, 142190, Троицк, ул. Пионерская, 2

⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

⁵Department of Physics and Astronomy, Macquarie University, NSW 2109, Australia

*E-mail: kattya.ivukina@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.10.2014

РЕФЕРАТ Актуальным направлением в современной медицинской диагностике является создание нацеленных на патологические мишени конструкций на основе фотолюминесцентных наночастиц, обладающих высокой фото- и химической стабильностью, а также спектрами поглощения и испускания фотолюминесценции в области «окна прозрачности» биоткани. В работе получена двухкомпонентная конструкция на основе антистоксовых нанофосфоров (НАФ) и противоопухолевых мини-антител 4D5scFv для селективного мечения клеток, гиперэкспрессирующих опухолевый маркер HER2, характерный для целого ряда метастазирующих опухолей человека. Высокоаффинная белковая пара барстар : барназа (Bs : Vn), обладающая чрезвычайной устойчивостью в широком диапазоне рН и температур, использована в качестве молекулярного адаптера, обеспечивающего самосборку двухкомпонентной конструкции. На клетках аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих HER2, показана высокая избирательность связывания полученной двухкомпонентной конструкции 4D5scFv-Vn : Bs-НАФ с опухолевыми клетками. Предложенный подход позволяет получать аналогичные конструкции для визуализации различных специфических маркеров в патогенных тканях, в том числе в злокачественных новообразованиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антистоксовые нанофосфоров, визуализация биомаркеров, противоопухолевые антитела, самосборка, HER2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; PBS – фосфатно-солевой буфер; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антител; sulfo-NHS – N-гидроксисульфосукцинимид; Vn – барназа; Bs – барстар; BSA – бычий сывороточный альбумин; НАФ – антистоксовые нанофосфоров; ПААГ – полиакриламидный гель; ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида с 1-октадеценом; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Использование модульных конструкций на основе белков суперсемейства иммуноглобулинов для направленной доставки лекарственных средств и диагностики является современным направлением молекулярной медицины, получившим название тераностика [1–3]. При этом особый интерес вызывает проблема создания направленных конструкций на основе фотолюминесцентных наночастиц, оснащенных нацеливающими модулями, которые обеспе-

чивают их доставку к клеткам-мишеням [4]. Такой подход позволяет разрабатывать принципиально новые высокоэффективные подходы для персонализированной оптической диагностики. Накапливаясь в клетках-мишенях, подобные конструкции могут выявлять их на фоне здоровых тканей за счет фотолюминесцентного ответа на возбуждение светом определенных длин волн. В частности, использование фотолюминесцентных конструкций, способных прицельно связываться с соответствующим клеточным

онкомаркером, обеспечивает наиболее чувствительную и неинвазивную раннюю диагностику онкологических заболеваний.

Клеточные онкомаркеры, такие, как HER2 – белок семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека, представлены в большом количестве в опухолевой ткани, где служат эффективными мишенями для выявления и терапии рака. HER2 гиперэкспрессирован во многих опухолях, включая опухоли яичников, шейки матки, мочевого пузыря, прямой кишки, желудка, пищевода и молочной железы, а уровень его экспрессии часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом и повышенной устойчивостью к химиотерапии [5]. Следовательно, создание HER2-направленных фотолюминесцентных конструкций представляет собой один из многообещающих подходов к ранней молекулярной диагностике рака. Направленная доставка обусловлена использованием входящего в состав конструкции нацеливающего модуля белковой природы. В качестве модуля, нацеленного на HER2, применяют полноразмерное гуманизованное моноклональное антитело 4D5, которое широко используется в клинической практике под коммерческим названием Herceptin® [6]. Антитело присоединяют к наночастице с помощью различных сшивающих реагентов или простой физической сорбции. В данной работе в качестве нацеливающего модуля использовали генно-инженерный фрагмент этого антитела, 4D5scFv, представляющий собой единую полипептидную цепь, в которой переменные домены легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина соединены коротким гибким линкером, а константные домены отсутствуют [7]. В качестве нацеливающего модуля фрагмент 4D5scFv привлекает особое внимание, поскольку способен так же эффективно узнавать HER2 [8–10], но, в отличие от полноразмерных антител, не обуславливает взаимодействий с рецепторами клеток иммунной системы и белками системы комплемента [11].

Для создания направленных конструкций авторами данной работы предложен принцип самосборки через систему белковых адаптеров барстар : барназа (Bs : Bn), которая позволяет комбинировать отдельные модули с разной функциональностью и создавать конструкции с заранее заданным набором свойств [12–15]. Бактериальная рибонуклеаза Bn и ее природный ингибитор Bs образуют высокопрочный комплекс с константой диссоциации $\sim 10^{-14}$ М [16] и высокой индивидуальной стабильностью в широком диапазоне pH и температур [17]. Кроме того, эти белки отличаются биотехнологичностью, и их применение позволяет улучшить свойства направленных конструкций. Например, Bn в составе генетически кодируемых белков слияния в ряде случаев играет

роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая правильное сворачивание составляющих доменов, включающих нацеливающие модули [18].

Антистоксовые нанофосфоры (НАФ) – это неорганические фотолюминесцентные наночастицы, фотолюминесценция которых происходит за счет ап-конверсии – процесса конвертирования нескольких фотонов с более низкой энергией (большей длиной волны) в один фотон с более высокой энергией (меньшей длиной волны). НАФ являются высокоэффективными контрастирующими агентами с уникальными фотолюминесцентными свойствами, они обладают целым рядом преимуществ по сравнению с флуоресцентными белками и органическими красителями, традиционно используемыми для оптической диагностики. К ним относятся исключительная устойчивость к фото- и химической деградации, возбуждение длинами волн (обычно 980 нм), попадающими в «окно прозрачности» биоткани, и продолжительная фотолюминесценция со сдвигом в коротковолновую область, в том числе в видимом и дальнем красном свете [19]. Кроме того, благодаря долгой фотолюминесценции существует возможность отложенной регистрации сигнала, которая позволяет практически полностью исключить автофлуоресценцию ткани и добиться значительного увеличения контрастности изображения на уровне отдельной наночастицы в условиях биологического окружения.

Направленные конструкции на основе НАФ были использованы в ряде работ, посвященных визуализации клеточных и тканевых структур [20], включая раковые клетки с повышенной экспрессией HER2. Описано нацеливание НАФ на HER2 за счет присоединенных к ним полноразмерных антител [21, 22]. В данной работе мы представляем новый подход к созданию направленных конструкций на основе НАФ и одноцепочечных мини-антител 4D5scFv, специфичных к онкомаркеру HER, путем самосборки через систему молекулярных адаптеров Bs : Bn.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез НАФ

Гидрофобные НАФ в форме кристаллов NaYF_4 , легированных ионами Yb^{3+} и Er^{3+} и имеющих на поверхности олеат-анион, были синтезированы по методу [23]. Кристаллы программируемого размера выращивали из раствора натриевых солей и олеиновой кислоты в бескислородной атмосфере. Смесь Y_2O_3 (0.78 ммоль), Yb_2O_3 (0.2 ммоль) и Er_2O_3 (0.02 ммоль) дефлегмировали в 70% трифторуксусной кислоте (20 мл) в течение 6 ч. Затем прозрачный раствор ох-

лаждали до комнатной температуры, растворитель выпаривали. Полученный осадок высушивали в вакууме 0.1 мм рт. ст. в течение 3 ч и тщательно растирали в агатовой ступке до гомогенного состояния. Этот порошок перемешивали с трифторацетатом Na (2 ммоль), олеиновой кислотой (6 мл) и 1-октадецином (6 мл) при 100°C под вакуумом в течение 30 мин.

Дегазированную и обезвоженную смесь постепенно нагревали до 290°C со скоростью 6°C/мин и выдерживали при этой температуре в течение 45 мин в атмосфере аргона. Затем температуру поднимали до 310°C в течение 70 мин. На следующем этапе раствор охлаждали, суспендировали в изопропанол (130 мл) и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин (центрифуга Z206A, Hermle, Германия). Полученные таким образом частицы промывали четырежды в абсолютном этаноле и высушивали. Затем частицы растворяли в хлороформе (10 мл), осаждали изопропанолом (50 мл) и дважды центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Целевой продукт высушивали при комнатной температуре.

Получение и характеристика белков

Рекомбинантный белок **4D5scFv-Vn**, состоящий из Vn и одноцепочечных мини-антител 4D5scFv, соединенных гибким пептидным линкером, получали как описано ранее [7] с небольшими модификациями. Клетки *Escherichia coli* штамма SB536 [F^- , WG1, $\Delta fhuA$ (ton Δ), $\Delta hhoAB$ (SacII), *shh*] трансформировали плазмидой pSD4D5VnHis5 с геном, кодирующим белок 4D5scFv-Vn под контролем *lac*-промотора, и геном Bs, конститутивный синтез которого защищает бактериальные клетки от цитотоксического действия Vn [24]. Трансформанты выращивали в питательном бульоне YTPS (1% дрожжевой экстракт, 1% триптон, 150 мМ NaCl, 40 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ $MgCl_2$, 0.1 г/л ампициллина, pH 7.5) при 37°C до достижения значения оптической плотности 0.6 при длине волны 560 нм; затем добавляли β -D-1-тиогалактопиранозид (1 мМ) для индукции *lac*-промотора и инкубировали в течение еще 5 ч. Полученную биомассу собирали центрифугированием (центрифуга Allegra 21R, Beckman Coulter, США) и разрушали ультразвуком во льду в лизирующем буфере 5 мМ Трис-HCl, 40 мМ K_2HPO_4 , 500 мМ NaCl, pH 8.2. Полученный экстракт осветляли центрифугированием и фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0.22 мкм и наносили на колонку HiTrap объемом 1 мл с аффинным сорбентом Ni-нитрилотриуксусной кислотой (Ni-NTA) (GE Healthcare Worldwide, США). Для освобождения целевого белка 4D5scFv-Vn от ингибитора Bs колонку промывали 8 М мочевиной с последующим рефолдингом 4D5scFv-Vn линейным градиентом мочевины

8–0 М. Целевой белок элюировали 225 мМ имидазолом, переводили в фосфатный буфер (20 мМ NaCl, 6.5 мМ NaH_2PO_4 , 41 мМ Na_2HPO_4 , pH 6.5) на обессоливающей колонке PD-10 (GE Healthcare Worldwide, США) и подвергали окончательной очистке на катионообменной колонке HiTrap SP-Sepharose Fast Flow объемом 1 мл (GE Healthcare Worldwide, США), элюцию проводили градиентом NaCl, фракции анализировали электрофорезом в 12.5% ПААГ. По данным электрофоретического анализа в 12.5 % ПААГ фракция целевого белка 4D5scFv-Vn элюировалась в 275 мМ NaCl.

Безцистеиновый мутантный вариант барстара **Bs (C40/82A)** получали из клеток *E. coli* штамма HB101 [$F^- \Delta(gpt-proA)62 leu B6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1\Delta(mcrC-mrr) rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13$], несущего плазмиду pMT641 [7]. Бактериальную культуру выращивали в бульоне YTPS до стационарной фазы, клетки отделяли центрифугированием и суспендировали в холодном буфере для лизиса следующего состава: 0.05 М Трис-HCl, 0.1 М NaCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, pH 8.0. Клетки разрушали ультразвуком во льду (30% насыщения $(NH_4)_2SO_4$), затем осаждали нуклеиновые кислоты полиэтиленимином. Из полученного клеточного экстракта осаждали белки, доводя концентрацию сульфата аммония до 70% насыщения. Осадок белков растворяли в буфере 0.1 М Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, pH 8.0 и фракционировали по размеру на колонке с Сефадексом G-100 SuperFine (C16/100), уравновешенной буфером 0.02 М Трис-HCl, 0.02 М NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит, 0.05% Tween-20, pH 8.0. Окончательную очистку Bs проводили на анионообменной колонке HiTrap Q-Sepharose Fast Flow объемом 1 мл (GE Healthcare Worldwide, США), уравновешенной буфером 0.2 М Трис-HCl, 2 мМ дитиотреит, 10% глицерин, pH 8.0. Целевой белок элюировали градиентом NaCl, фракции анализировали электрофорезом в 17% ПААГ.

Рибонуклеазная активность рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn

Рибонуклеазную активность рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn определяли методом кислотонерастворимого осадка РНК [25]. 40 мкл раствора анализируемого белка с концентрацией от 30 до 0.015 нМ в буфере 0.125 М Трис-HCl, pH 8.5 смешивали с 160 мкл раствора дрожжевой РНК (2 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. РНКазную реакцию останавливали добавлением 6% $HClO_3$ (200 мкл), смесь выдерживали при +2°C в течение 15 мин. Непрореагировавшую РНК отделяли центрифугированием. По оптическому поглощению (OD_{260}) определяли концентрацию освобожденных нуклеотидов,

которая была прямо пропорциональна РНКазной активности исследуемого белка.

Для оценки связывания пары $B_s : B_n$ различные разведения B_s добавляли к раствору B_n в известной концентрации, РНКазную активность измеряли как описано выше. В последнем случае концентрация B_s была обратно пропорциональна OD_{260} .

Аффинность белка 4D5scFv-HER2/neu к рецептору HER2

Аффинность белка 4D5scFv-HER2/neu к рецептору HER2 оценивали с использованием поликлональных кроличьих античеловеческих антител IgG. На полистироловые 96-луночные планшеты с плоским дном наносили антиген p185HER2^{ECD} (рекомбинантный белок, представляющий собой внеклеточный домен рецептора HER2) в буфере 0.1 M Na₂CO₃, 0.1 M NaHCO₃, pH 9.2 в количестве 8 и 16 нг/лунку. После адсорбции антигена в течение 1 ч планшеты промывали буфером PBS и блокировали ненасыщенные поверхностные участки связывания 5% раствором сухого молока (Tesco, Великобритания) в буфере PBS, pH 7.4. Раствор белка 4D5scFv-Bn в буфере PBS с 0.1% Tween-20 в различных концентрациях, начиная с 5 нМ, вносили в лунки и инкубировали в течение 1 ч на качалке, затем промывали. Для детекции иммобилизованного белка 4D5scFv-Bn планшеты обрабатывали поликлональными кроличьими античеловеческими антителами IgG, а затем козлиными антикроличьими антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена, с промывками между стадиями. Для колориметрического измерения в лунки добавляли 0.04% 1,2-диаминобензена (Sigma-Aldrich, Германия) с 0.06% H₂O₂ в цитратном буфере (7.3 г/л лимонной кислоты, 11.86 г/л Na₂HPO₄·2H₂O, pH 5). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 M H₂SO₄ и определяли OD₄₅₀ на планшетном спектрофотометре (StatFax-2100, Awareness Technology, США). Константу аффинности K_a рассчитывали, как описано в работе [26], приняв во внимание моновалентность исследуемого мини-антитела, по следующей формуле:

$$K_a = (n - 1)/n[Ab]_t - [Ab]_f, \quad (1)$$

где $[Ab]_t$ и $[Ab]_f$ – суммарные концентрации мини-антитела в лунках со значениями OD₄₅₀' и OD₄₅₀°, обработанных антигеном в концентрации $[Ag]'$ (8 нг) и $[Ag]$ (16 нг) соответственно, $n = [Ag]_t / [Ag]_f$. (2)

Получение биоконъюгатов НАФ

НАФ, синтезированные как описано выше, покрывали амфифильным чередующимся сополимером малеинового ангидрида с 1-октадецином (ПМАО,

Sigma-Aldrich, Германия) как описано в работе [27] с небольшими модификациями. Для создания вокруг частиц НАФ оболочки ПМАО и образования поперечных сшивок добавляли 1,6-диаминогексан (Serva, Германия). Чтобы присоединить биомолекулы к НАФ, поверхностные карбоксильные группы полученной оболочки ПМАО активировали в холодном буферном растворе избытком кросс-линкеров 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид (sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, Германия) с дополнительной обработкой ультразвуком. Полученные наночастицы затем отмывали от непрореагировавших кросс-линкеров центрифугированием при 4°C, ресуспендировали в холодном растворе белка B_s и выдерживали в течение ночи для присоединения B_s . Несвязавшиеся молекулы B_s отмывали в ходе трех циклов центрифугирования/ресуспендирования. Полученные наночастицы хранили в PBS.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

НАФ и НАФ-ПМАО растворяли в *n*-гексане и воде соответственно, озвучивали и наносили на медные сетки (300 меш) для ТЭМ, покрытые 0.3% раствором Pioloform® (Wacker Polymer Systems, Burghausen, Германия). Затем сетки высушивали при $t_{комн}$ в течение ночи в эксикаторе и микроскопировали на приборе Philips CM10 ТЕМ (Philips, Нидерланды). Для анализа фракционного состава НАФ использовали программу ImageJ.

ИК-спектроскопия

Свободный ПМАО тщательно растирали в ступке с KBr и прессовали в форме таблеток. НАФ, модифицированные ПМАО, высушивали с помощью концентратора Savant SpeedVac (Франция), затем растирали с KBr и прессовали в форме таблеток. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Varian 3100 (США).

Определение спектров эмиссии НАФ-ПМАО

Порошок НАФ-ПМАО помещали в держатель для образцов и освещали лазером с длиной волны 978 нм посредством мультимодального оптического волокна. Сигнал излучения записывали в проходящем свете на калиброванном спектрофотометре (Ocean Optics, США), предварительно пропустив через эмиссионный фильтр с полосой пропускания до 842 нм (Semrock, США).

Мечение клеток

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 и клетки яичника китайского хомячка CHO-K1 (American Type Culture Collection, США)

культивировали в культуральной среде RPMI 1640 (HyClone, США) с добавлением L-глутамина и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Клетки рассеивали на 8-луночные предметные стекла в концентрации 3×10^4 клеток/мл и культивировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂), затем клетки инактивировали добавлением 1% формальдегида для предотвращения неспецифической интернализации. Для предотвращения неспецифического связывания частиц покровные стекла обрабатывали в течение 1 ч 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Bio-Rad, США) в буфере PBS. Затем для создания на поверхности клеток участков специфического связывания визуализирующего агента, Bs-НАФ, на стекла наносили раствор рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn в буфере PBS с 0.1% BSA и 0.1% Tween-20 и инкубировали в течение 1 ч. Затем клетки промывали буфером PBS и обрабатывали коллоидным раствором Bs-НАФ (100 мкг/мл) в течение 20 мин. Этого времени было достаточно для завершения образования комплексов 4D5scFv-Vn : Bs-НАФ благодаря исключительно высокой константе аффинности пары Bs : Vn $\sim K_d 10^{-14}$ М.

Затем клетки промывали несколько раз от несвязавшегося Bs-НАФ, фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS и закрывали покровным стеклом. Для того чтобы доказать, что связывание НАФ не является результатом неспецифической адсорбции белка 4D5scFv-Vn на стеклах, использовали клетки СНО в качестве отрицательного контроля.

Фотолюминесцентная микроскопия клеток

Фотолюминесцентную микроскопию клеток проводили на инвертированном эпилюминесцентном микроскопе Olympus IX70 (Япония) с возбуждающим 978-нм диодным лазером (LD980-01CW, CXCH-Photonics, Китай). Для получения изображения клеток в видимом свете использовали сухой объектив $\times 50$, NA 0.45 (Olympus, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидрофобные НАФ в форме кристаллов NaYF₄, легированных ионами Yb³⁺ и Er³⁺ и имеющих на поверхности олеат-анион, были синтезированы методом, описанным ранее [23]. С целью придания гидрофильности частицы в дальнейшем были покрыты молекулами чередующегося сополимера поли(малеинового ангидрида-1-октадецена) (ПМАО), связанными между собой с помощью 1,6-диаминогексана (Serva, Германия). При переводе частиц НАФ-ПМАО из органического растворителя в воду ангидридное кольцо раскрывается, образуя карбоксильные группы, экспонированные в раствор,

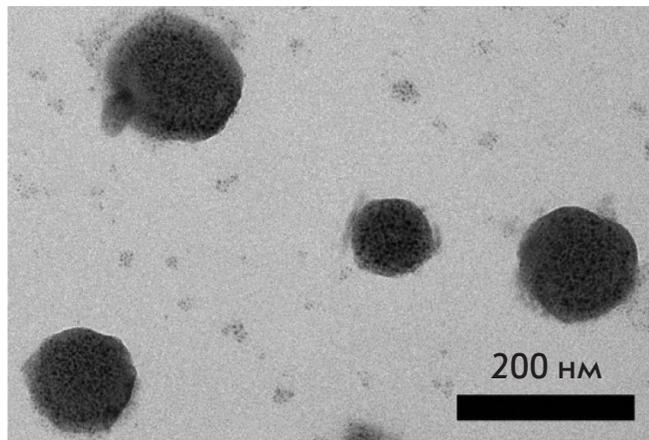
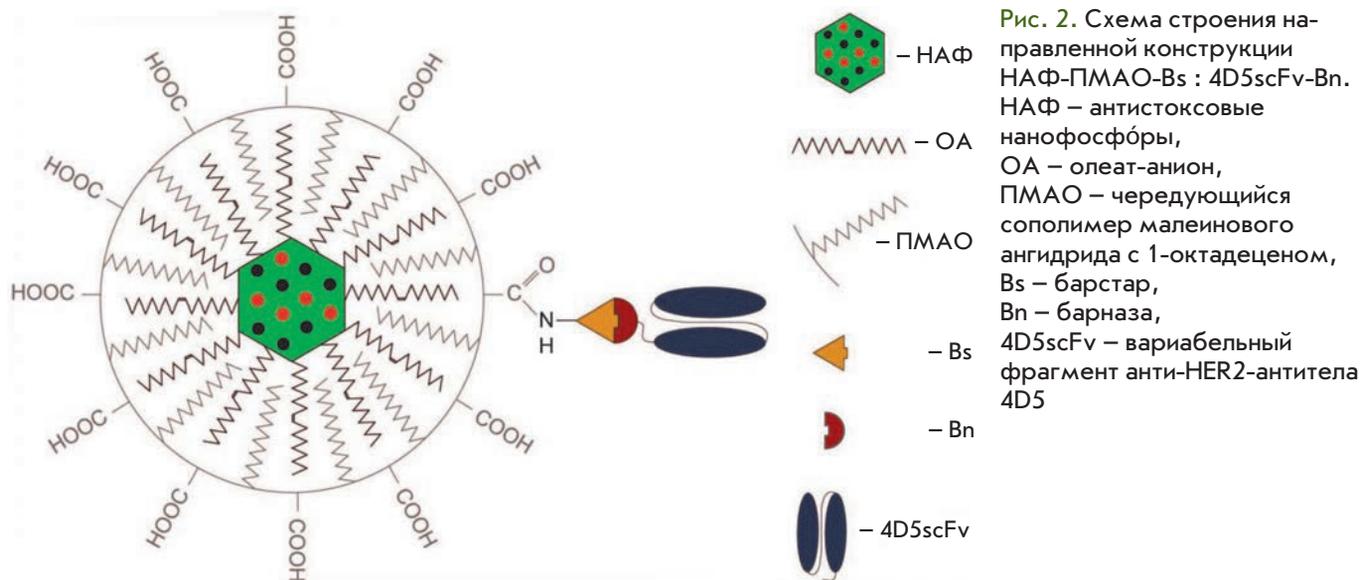


Рис. 1. Изображение НАФ-ПМАО, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа

что обеспечивает растворимость НАФ в воде [27]. Гидродинамический диаметр НАФ-ПМАО, измеренный методом динамического светорассеяния, составил 130 ± 20 нм. На рис. 1 приведено изображение наночастиц, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, с полимицеллярной структурой ПМАО на поверхности НАФ. По результатам измерений калиброванной интегрирующей сферой максимальная эффективность ап-конверсии наночастиц была достигнута при возбуждении лазером с плотностью мощности ~ 60 Вт/см² и составила 1.2%.

Оценка потенциала НАФ в качестве агентов для оптической визуализации клеток-мишеней была проведена *in vitro* с использованием клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих поверхностный онкомаркер HER2. С этой целью была создана направленная двухкомпонентная конструкция, включающая контрастирующий и нацеливающий модули, способные собираться посредством системы молекулярных адаптеров Bs : Vn, как изображено на рис. 2. Контрастирующий модуль был получен путем конъюгации мутантного Bs C40/82A с карбоксильными группами НАФ-ПМАО с использованием сшивающих реагентов 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид. Полученные конъюгаты сохранили неагрегированное состояние и фотолюминесцентные характеристики. Нацеливающий модуль, способный с высокой эффективностью связываться с внешним доменом рецептора HER2 на поверхности опухолевых клеток, представлял собой рекомбинантный белок слияния 4D5scFv-Vn, описанный в работе [7]. В нем к C-концевой части одноцепочечного мини-антитела 4D5scFv через гибкий



пептидный линкер присоединена Bn, и доказано [7], что оба полипептида сохранили свои функциональные свойства – способность специфически распознавать рецептор HER2 (4D5scFv) и способность к высокоаффинному связыванию с Bs (Bn).

Высококонтрастная визуализация клеток SK-BR-3 с использованием описанной двухкомпонентной конструкции была осуществлена методом двухстадийной доставки. С целью распознавания рецептора HER2 клетки, выращенные на подложке и зафиксированные формальдегидом, были обработаны нацеливающим модулем 4D5scFv-Bn. Затем для визуализации к клеткам был добавлен контрастирующий модуль Bs-НАФ, который, связываясь с Bn, входящей в состав уже иммобилизованного на HER2 модуля 4D5scFv-Bn, обеспечивал оптическую детекцию. После инкубации избыток Bs-НАФ был удален путем тщательной отмывки клеток фосфатным буфером. В качестве отрицательного контроля были использованы клетки яичника китайского хомячка CHO, лишенные HER2. С помощью фотолюминесцентной микроскопии клеток SK-BR-3 и CHO, последовательно обработанных модулями 4D5scFv-Bn и Bs-НАФ, с возбуждением люминесценции на длине волны 978 нм (рис. 3) было показано, что полученная двухкомпонентная конструкция 4D5scFv-Bn : Bs-НАФ избирательно связывается с клетками SK-BR-3, гиперэкспрессирующими рецептор HER2, и не связывается с контрольными клетками CHO, лишенными HER2. Общий сигнал люминесценции с поверхности опухолевых клеток SK-BR-3 в 10 раз превышал сигнал с поверхности контрольных клеток CHO.

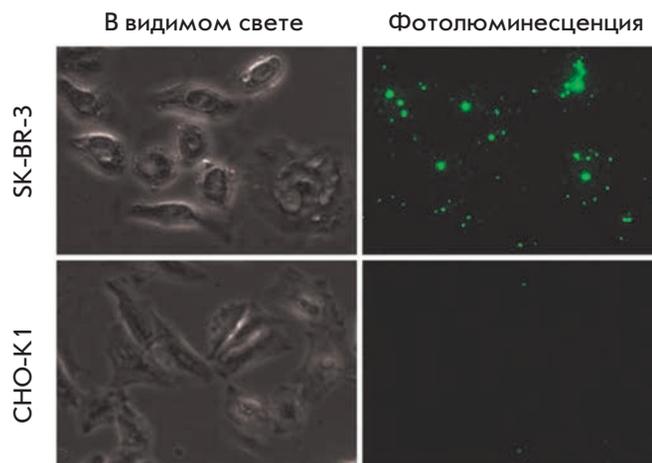


Рис. 3. Фотолюминесцентные изображения клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2, и клеток CHO (отрицательный контроль) после обработки НАФ-ПМАО-Bs и 4D5scFv-Bn

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные гибридные конструкции, состоящие из молекул нацеливающих биополимеров и неорганических фотолюминесцентных нанокристаллов, способны высокоспецифично визуализировать онкомаркер на опухолевых клетках. Такие наноконструкции могут служить перспективными носителями для направленной доставки самых различных цитотоксических и визуализирующих агентов, что создает принципиально новые возмож-

ности для высокоточной молекулярной диагностики и эффективной терапии опухолевых заболеваний. Важным преимуществом конструкций с использованием НАФ [28] является возможность их регистрации в глубине живой ткани, чем определяется их особенная перспективность для персонализированной оптической диагностики злокачественных новообразований. ●

Работа поддержана РФФ (грант 14-24-00106) – синтез биоконъюгатов с наночастицами и исследование их взаимодействия с раковыми клетками; программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Минобрнауки РФ (№ 14.578.21.0051, 14.Z50.31.0022) – получение и характеристика рекомбинантных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. P. 716–722. doi: 10.1038/nnano.2014.156.
- Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova F.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLOS One. 2011. V. 6. e20991.
- Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // Nanomedicine (London). 2011. V. 6. P. 195–209.
- Поляновский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 289–311.
- Nahta R., Esteve F.J. // Cancer Lett. 2006. V. 232. P. 123–138.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // Nat. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
- Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., et al. // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. P. 021004.
- Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 9221–9225.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Invest. New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // PLOS One. 2012. V. 7. e48248.
- Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Gene. 2006. V. 366. P. 97–103.
- Sreenivasan V.K.A., Ivukina E.A., Deng W., Kelf T.A., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Veryugin B.V., Stremovskiy O.A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 65–68.
- Schreiber G., Fersht A.R. // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. № 5. P. 427–431.
- Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // ACS Nano. 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
- Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odincov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // Protein Engineering Design Selection. 2004. V. 17. P. 85–93.
- Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // J. Biomed. Opt. 2013. V. 18. P. 76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Xiong L., Chen Z., Tian Q., Cao T., Xu C., Li F. // Anal. Chem. 2009. V. 81. № 21. P. 8687–8694.
- Dou Q., Idris N.M., Zhang Y. // Biomaterials. 2013. V. 34. № 6. P. 1722–1731.
- Yi G., Peng Y., Gao Z. // Chem. Mater. 2011. V. 23. P. 2729–2734.
- Mai H., Zhang Y., Sun L., Yan C. // J. Phys. Chem. C. 2007. V. 111. P. 13721–13729.
- Yazynin S.A., Deyev S.M., Jucovic M., Hartley R.W. // Gene. 1996. V. 169. № 2. P. 131–132.
- Rushizky G.W., Greco A.E., Hartley R.W., Jr., Sober H.A. // Biochemistry. 1963. V. 2. № 4. P. 787–793.
- Zhan Q., Qian J., Liang H., Somesfalean G., Wang D., He S., Zhang Z., Andersson-Engels S. // ACS Nano. 2011. V. 5. № 5. P. 3744–3757.
- Pellegrino T., Manna L., Kudera S., Liedl T., Koktysh D., Rogach A.L., Keller S., Rädler J., Natile G., Parak W.J. // Nano Lett. 2004. V. 4. P. 703–707.
- Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 10. P. 5161–5214.

УДК 573.6

Создание высокоэффективного флуоресцентного зонда для изучения биodeградации фармакологических белковых препаратов *in vivo*

С. С. Терехов^{1*}, И. В. Смирнов^{1,4}, О. Г. Шамборант¹, М. А. Зенкова², Е. Л. Черноловская², Д. В. Гладких², А. Н. Мурашев³, И. А. Дьяченко³, В. Д. Кнорре¹, А. А. Белогуров^{1,4,5}, Н. А. Пономаренко¹, С. М. Деев¹, В. В. Власов², А. Г. Габиров^{1,4,5}

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

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

³Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, Московская обл.

⁴Казанский федеральный университет, 420008, Казань, Республика Татарстан, ул. Кремлевская, 18

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

*E-mail: sterekhoff@gmail.com

Поступила в редакцию 31.10.2014

РЕФЕРАТ Рекомбинантные белки стали одними из лидирующих среди современных фармакологических препаратов. Вместе с тем существующие методы анализа фармакокинетики в большинстве своем не учитывают процесс биodeградации белкового препарата. Закономерности биodeградации белкового фармпрепарата позволяют определить основные пути его выведения из организма при проведении доклинических испытаний. Использование флуоресцентных агентов высокой яркости красного и дальне-красного диапазона дает возможность проводить неинвазивные исследования выведения и распределения белковых препаратов в живом организме. Мы предложили использовать метод избыточной конъюгации белков флуорофорами для создания зонда, позволяющего наблюдать биodeградацию рекомбинантной бутирилхолинэстеразы в организме живой мыши. Установлено, что максимум разгорания флуоресценции, отражающей деградацию фермента, наблюдается через 6 ч после внутривенного введения препарата. Показано, что избыточная конъюгация флуорофора приводит к существенному изменению фармакокинетических параметров препарата. Этот факт необходимо учитывать при выборе метода флуоресцентного «биоимиджинга» при проведении фармакокинетических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биodeградация, бутирилхолинэстераза, фармакокинетика, флуоресцентный зонд, протеолиз, самотушение, *in vivo*-визуализация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронная эмиссионная томография; HIV – вирус иммунодефицита человека; rhBChE – рекомбинантная тетрамерная бутирилхолинэстераза человека; PRAD – proline-rich attachment domain, пролин-богатый домен связывания; MMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа; sCy5 – Sulfo-Cyanine5; sCy7 – Sulfo-Cyanine7; F_{\max} – относительное разгорание флуоресценции; F_{enz} – интенсивность флуоресценции гидролизованного образца; F_0 – интенсивность флуоресценции образца до протеолитического гидролиза; N – степень модификации препаратов; rhBChE-sCy7 ON – флуоресцирующий конъюгат rhBChE-sCy7 без эффекта самотушения; rhBChE-sCy7 OFF – нефлуоресцирующий конъюгат rhBChE-sCy7 с эффектом самотушения; BSA – бычий сывороточный альбумин; KLH – гемоцианин.

ВВЕДЕНИЕ

Современная фармакокинетика – высокотехнологичная область, использующая самые современные неинвазивные подходы, такие, как однофотонная

эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) и флуориметрия *in vivo* не только для анализа фармакокинетических параметров, но и для определения про-

филя биораспределения и накопления препаратов [1]. В связи с широким внедрением в современные протоколы, применяемые при таких серьезных заболеваниях, как рак [2, 3], аутоиммунные патологии [4] и заболевания крови [5], рекомбинантных белковых препаратов на повестку дня остро встал вопрос изучения биораспределения и биодegradации этих лекарственных средств в организме животного в ходе доклинических испытаний. Обнаружение новых инфракрасных флуоресцентных красителей, обладающих высокой яркостью и позволяющих работать в «окне прозрачности» биологических тканей (700–900 нм), наряду с их коммерческой доступностью, безопасностью и эффективностью, позволило осуществить переход к «биоимиджингу» флуоресценции в качестве одного из наиболее распространенных методов визуализации [6, 7]. На основании результатов визуализации можно сделать вывод о том, в каком органе происходит накопление препарата [8], а также каковы фармакокинетические характеристики его выведения [9] из организма. Для препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих определенной специфической активностью, крайне важно знать, как связано накопление препарата в том или ином органе и его деградация. Знание о закономерностях биодegradации препарата играет особую роль в том числе и потому, что позволяет определить основные пути его выведения.

Цель данной работы состояла в создании зонда, позволяющего определить основные компартменты биодegradации рекомбинантного белка, на примере рекомбинантной бутирилхолинэстеразы, биологического антидота против фосфорорганических ядов нервно-паралитического действия [10, 11]. В основе использованного нами подхода лежит явление самотушения флуорофоров [12]. Суть его заключается в том, что для молекул флуорофоров, обладающих небольшим стоксовским сдвигом (порядка 20–30 нм) и расположенных на расстоянии менее 10 нм друг от друга, характерно тушение флуоресценции. Эффективность тушения зависит, в том числе и от способности к агрегации молекул флуорофора в основном за счет π - π - и гидрофобных взаимодействий [13]. Таким образом, избыточная модификация препарата белковой природы, инфракрасным флуорофором, склонным к самотушению, приводит к образованию конъюгата с «выключенной» флуоресценцией, в то время как его деградация и образование пептидных продуктов приведет к «разгоранию» флуоресценции. Аналогичный подход уже нашел применение в визуализации опухолей по наличию MMP-активности, специфических или гиперэкспрессированных рецепторов [14–18], в исследовании активности протеолитических анти-

тел к поверхностному белку HIV; gp120 [19]. В данной работе мы предложили использовать избыточное мечение рекомбинантной бутирилхолинэстеразы для прижизненной визуализации компартментов, ответственных за разложение и выведение препарата, а также для оценки параметров биораспределения и биодegradации фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белковые препараты, использованные в работе

Рекомбинантная тетрамерная бутирилхолинэстераза человека (rhBChE) была получена в клетках линии CHO-K1, трансфицированных конструкцией pFUSE PRAD-F2A-BChE, в которых одновременно экспрессируется ген пептида тетрамеризации (PRAD) и бутирилхолинэстеразы человека. rhBChE была последовательно очищена методами аффинной хроматографии с использованием сорбента прокаинамид-сефарозы на колонке XK10/50 (GE Healthcare, США) и ионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50 (GE Healthcare, США). Чистота белка составляла более 95% по результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием красителем Кумасси и окрашиванием на наличие специфической бутирилхолинэстеразной активности по методу Karnovsky и Roots [20]. Коммерчески доступные белки KLH и BSA были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Синтез препаратов флуоресцентно меченных белков

Белки были конъюгированы с различными NHS-активированными флуорофорами класса цианиновых красителей: Sulfo-Cyanine5 (sCy5), Sulfo-Cyanine7 (sCy7) (Lumiprobe). Конъюгацию проводили в 0.1 M NaHCO₃ согласно протоколу производителя. Флуоресцентно меченные белки очищали от продуктов реакции методом гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare, США). Флуоресценцию препаратов белков измеряли на приборе Varioscan Flash (Thermo Scientific). Для определения максимального относительного разгорания флуоресценции образцы белков предварительно подвергали протеолизу раствором, содержащим смесь протеаз (1 мг/мл протеиназы K (Fermentas) и 2 мг/мл субтилизина Карлсберг) в фосфатно-солевом буфере pH 7.4 при 37°C в течение 4 ч. Полноту реакции протеолиза оценивали спектрофлуориметрически по выходу на насыщение кривой зависимости интенсивности флуоресценции (RFU) от времени. Относительное разгорание флуоресценции (F_{\max}) вычисляли как отношение разницы интенсивности флуоресценции гидроли-

Таблица 1. Характеристика использованных препаратов конъюгатов белков с флуорофорами

Препарат	N	F_0 , RFU	F_{enz} , RFU	F_{max}
BSA-FITC [23]	25	-	-	3450
KLH-sCy5	380–750	6.25	1140	18100
BSA-sCy5	6.7	2.37	1680	70800
rhBChE-sCy5	30	6.17	1750	28300
BSA-sCy7	6.5	1.8	660	36500
rhBChE-sCy7 OFF	32	2.71	597	21900
rhBChE-sCy7 ON	1	50	50.05	0.1

Примечание. N – степень модификации; F_0 – флуоресценция до протеолитического расщепления; F_{enz} – флуоресценция после протеолитического расщепления.

зованного образца (F_{enz}) и интенсивности флуоресценции образца до протеолитического гидролиза (F_0): $F_{max} = (F_{enz} - F_0)/F_0 \times 100\%$. Степень модификации препаратов (N), т.е. количество групп флуорофора на молекулу белка, определяли путем измерения оптической плотности растворов при длине волны 280 нм ($E^{1\%} = 18$) и при 760 нм исходя из коэффициентов молярного поглощения $240600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для sCy7.

Определение фармакокинетических параметров конъюгатов rhBChE-sCy7

Для оценки концентрации конъюгатов rhBChE в плазме крови использовали три группы мышей линии BALB/c по шесть животных в каждой, которым внутривенно были введены препараты конъюгированной rhBChE (без флуоресцентной метки, rhBChE-sCy7 ON и избыточно конъюгированного препарата rhBChE-sCy7 OFF) в дозе 200 мкг/мышь. Концентрацию BChE в сыворотке крови мышей определяли исходя из ее активности по методу Элмана [21]. Фармакокинетические характеристики препаратов получали исходя из аппроксимации кривой выведения rhBChE в рамках двухкамерной модели [10].

Эксперименты по визуализации *in vivo*

Биораспределение и паттерн деградации rhBChE определяли с использованием препаратов rhBChE-sCy7 OFF и rhBChE-sCy7 ON. Мышам линии BALB/c внутривенно были введены препараты конъюгатов rhBChE-Sulfo-Cyanine7 в дозе 500 мкг/мышь. Систему для оптической визуализации малых животных In Vivo MS FX PRO (Bruker) использовали для оценки распределения BChE и продуктов ее разложения. Для детекции флуоресценции sCy7 использовали фильтры возбуждения и эмиссии 730 и 790 нм соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод тушения/разгорания флуоресценции избыточно меченых белковых субстратов за счет их про-

теолитической деградации был успешно использован для исследования биокатализаторов с невысоким уровнем протеолитической активности [22] или анализа малых концентраций ферментов [23].

Очевидно, что использование флуоресцеина в качестве источника аналитического сигнала неприменимо в случае исследований *in vivo*, вследствие высокого фона органов и тканей. Для исключения этого недостатка мы применили конъюгацию белковых молекул с красителями sCy5, sCy7 в различных условиях.

Дополнительно мы предположили, что применение «красных» и «дальне-красных» флуорофоров позволит получить более чувствительные зонды для оценки протеолитической активности за счет более эффективного разгорания флуоресценции. Для анализа неспецифической активности мы использовали классические белки-субстраты – бычий сывороточный альбумин (BSA) и гемоцианин (KLH), а также бутирилхолинэстеразу – фармакологически важный препарат, биологический антидот при отравлениях фосфорорганическими токсинами. В результате были получены препараты KLH-sCy5, BSA-sCy5, rhBChE-sCy5, BSA-sCy7, rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF (табл. 1).

Полученные конъюгаты подвергали ферментативному гидролизу для определения эффективности разгорания флуоресценции. Все флуоресцентные субстраты характеризовались высоким уровнем максимального разгорания флуоресценции (F_{max}) (табл. 1), превышающим уровень классического субстрата BSA-FITC. Наибольшей эффективностью отличается препарат rhBChE-sCy5, в котором флуоресценция увеличивалась более чем в 700 раз.

Препарат rhBChE-sCy7 ON обладал одинаковой флуоресценцией до и после протеолиза, в то время как флуоресценция образца rhBChE-sCy7 OFF была значительно потушена и возрастала в 220 раз после протеолитического расщепления. Таким образом, препарат rhBChE-sCy7 OFF может служить зондом

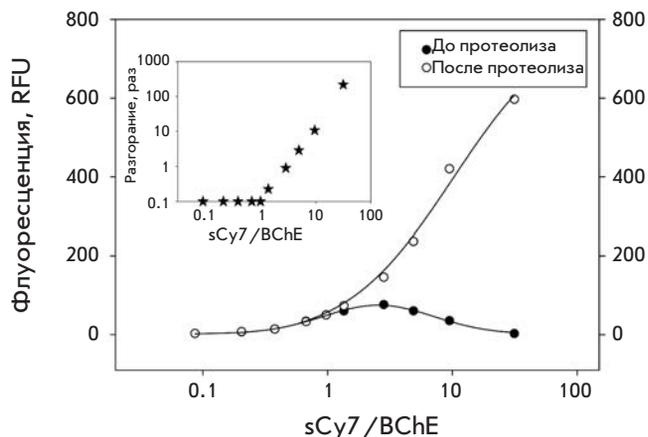


Рис. 1. Анализ вариантов конъюгатов бутирилхолинэстеразы с различной степенью модификации флуорофором sCy7

для оценки протеолитической деградации препарата в фармакокинетических экспериментах. Нами были проанализированы несколько вариантов избыточной конъюгации бутирилхолинэстеразы для получения максимально эффективного флуоресцентного зонда. Мы опирались на два критерия отбора – относительное разгорание флуоресценции и удельная активность фермента после модификации (рис. 1). В результате был выбран вариант со степенью модификации 32, при этом нам удалось добиться сохранения более 70% специфической активности.

Фармакокинетические исследования препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF

При исследовании фармакокинетических параметров препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF мы воспользовались уникальной возможностью оценки количества бутирилхолинэстеразы в кровотоке кинетическим и флуоресцентным методами одновременно. Действительно, в классическом способе оценки фармакокинетических параметров белковых препаратов используется либо прямой радиоактивный метод, либо косвенные методы (например, ИФА).

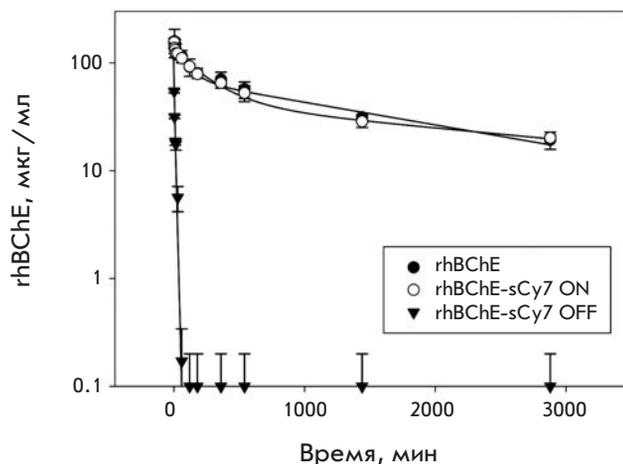


Рис. 2. Анализ фармакокинетических параметров выведения препаратов бутирилхолинэстеразы и ее конъюгатов с флуорофором sCy7

Однако все эти методы зачастую свидетельствуют только о наличии части белка (содержащей радиоактивную метку либо эпитоп связывания со специфическим антителами соответственно), но не доказывают присутствия активного белкового препарата. В случае бутирилхолинэстеразы биологическим антитодом является только активный фермент, следовательно, наблюдая за изменением активности препарата в кровотоке, можно судить о его «реальных» фармакокинетических параметрах. Флуоресцентный зонд указывает на наличие как целого белка, так и его фрагментов, таким образом, сравнение профилей выведения, наблюдаемых двумя различными методами, свидетельствует о деградации препарата на фоне его элиминации из организма.

Как показано на рис. 2 и в табл. 2, характер и параметры выведения препарата rhBChE-sCy7 ON такие же, как у фермента, не подвергнутого модификации, в то время как поведение препарата rhBChE-sCy7 OFF в организме кардинально изменено. Скорость выведения экстремально увеличивается (табл. 2).

При анализе профилей выведения препарата, определяемых по флуоресценции в различные про-

Таблица 2. Фармакокинетические параметры бутирилхолинэстеразы и ее конъюгатов с флуорофором sCy7

Параметры	rhBChE	rhBChE-sCy7 ON	rhBChE-sCy7 OFF
$\tau_{1/2}$ disr, мин	100 ± 40	140 ± 50	6 ± 2
$\tau_{1/2}$ el, мин	1600 ± 300	2200 ± 400	
MRT, мин	2400 ± 600	2700 ± 700	9 ± 3

межутки времени после введения препарата (рис. 3), установлено, что максимальный уровень флуоресценции наблюдается в промежутке 1.5–8 ч после введения. Можно утверждать, что в это время достигается максимум накопления препарата в печени, где и происходит активная деградация фермента, что отражается в увеличении флуоресценции (рис. 4). Фармакокинетическая кривая выведения rhBChE-sCy7 ON с использованием флуоресцентной детекции (рис. 3) не имеет статистически значимых отличий от аналогичной кривой выведения rhBChE-sCy7 ON, определенной по ферментативной активности (рис. 2). Следовательно, флуоресцентная детекция распределения фермента адекватно отражает накопление rhBChE в том или ином компартменте. В то же время сравнение аналогичных кривых для препарата rhBChE-sCy7 OFF очевидно свидетельствует о наличии двух различных процессов: 1 – быстрое выведение rhBChE-sCy7 OFF из кровотока (приводящее к быстрой потере активности rhBChE в кровотоке, но не сопровождаемое ростом флуоресценции), не связанное с деградацией rhBChE-sCy7 OFF; 2 – медленная деградация препарата rhBChE-sCy7 OFF в месте накопления (при нулевой активности rhBChE в кровотоке флуоресценция возрастает и достигает своих максимальных значений).

Результаты оценки биораспределения препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF в органах мыши, полученные в условиях измерения *in vivo*, приведены на рис. 4. Как следует из рис. 4, оба препарата в основном накапливаются в печени, почках и мочевом пузыре. Основным органом, отвечающим за деградацию фермента, является печень, и максимум разгорания флуоресценции, отражающей деградацию фермента, наблюдается через 6 ч после внутривенного введения препарата, продукты разложения попадают в кровь и выводятся преимущественно почками. Следовательно, данные прижизненного распределения белкового препарата в основном подтверждают наблюдения, полученные на предыдущих этапах (см. рис. 2, 3, табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентные зонды являются простым и очень чувствительным методом детекции протеолитической активности. С развитием химии флуоресцентных красителей появилась возможность создавать субстраты с высоким уровнем флуоресценции и низким уровнем фонового сигнала. Нам удалось получить панель флуоресцентных субстратов на основе белков, избыточно конъюгированных флуорофорами Sulfo-Cyanine5 и Sulfo-Cyanine7, для лучшего из которых, BSA-sCy5, достигнуто 700-кратное разгорание флуоресценции.

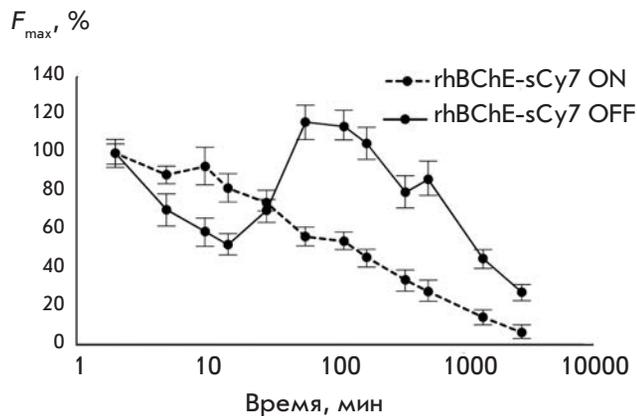


Рис. 3. Анализ кинетики выведения конъюгатов бутирилхолинэстеразы с sCy7, наблюдаемых по флуоресценции

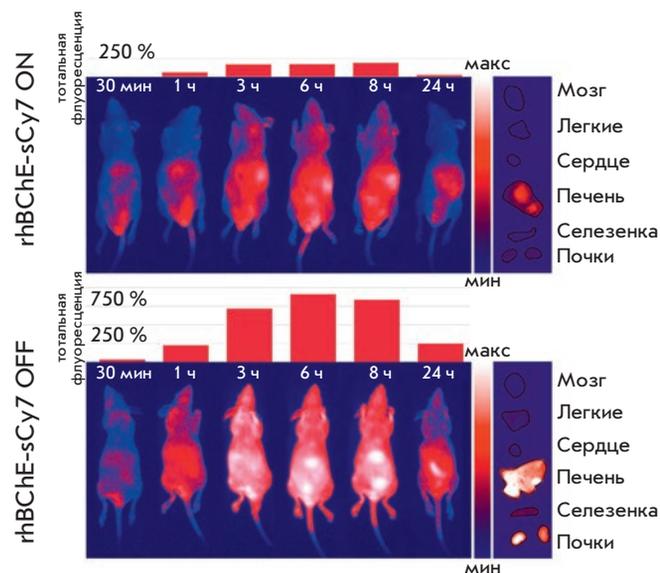


Рис. 4. Анализ биораспределения препаратов конъюгатов бутирилхолинэстеразы с флуорофором sCy7 методом флуоресцентного «биоимиджинга»

Использование избыточно меченого препарата для прижизненной визуализации органов и тканей, ответственных за разложение и выведение терапевтических препаратов, позволяет более полно охарактеризовать поведение белковых препаратов в организме. Очевидно, что попытки улучшить фармакокинетические параметры потенциальных лекарственных средств должны учитывать характер и место деградации потенциального лекарства. Использование методов увеличения времени нахождения препарата в кровотоке совместно с попытками

сократить скорость накопления препарата в печени может помочь в создании лекарственных средств пролонгированного действия. Стоит отметить, что это универсальный подход, который позволяет изучать деградацию любого белка или достаточно крупного пептида *in vivo*. Вместе с тем необходимо учитывать, что избыточное мечение может кардинальным образом изменить фармакокинетические характеристики и способ выведения белкового препарата [24], и это необходимо учитывать при выборе метода флуоресцентного «биоимиджинга» при проведении фармакокинетических исследований. Предложенный подход может оказаться крайне актуальным при проведении сравнительных доклинических исследований панели схожих рекомбинантных белковых препаратов и выбора оптимального кандидата с мишень-направленным действием. ●

Исследования проведены при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57614X0184), Президиума

Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология», ГК Минпромторга России (№ 13411.1008799.13.128 шифр «2.1 Антидот 2013») и персональной стипендии Президента России СП-2477.2013.4 (И.С.), гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ НШ-2064.2014.14 «Химические основы биокатализа», программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», проект «Нанолечения для лечения нейродегенеративных заболеваний, сконструированные на основе фрагментов основного белка миелина, компартиментализованные в липосомные контейнеры», РФФИ (14-04-00647 А, 14-04-31207 мол_а), РФФИ (14-24-00106). Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoppin J., Orcutt K.D., Hesterman J.Y., Silva M.D., Cheng D., Lackas C., Ruscowski M. // JPET. 2011. V. 337. № 2. P. 350–358.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Invest. New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32.
- Sreenivasan V.K., Stremovskiy O.A., Kelf T.A., Heblinski M., Goodchild A.K., Connor M., Deyev S.M., Zvyagin A.V. // Bioconjugate Chem. 2011. V. 22. № 9. P. 1768–1775.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. e20991.
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Vorobiev A.I. // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 2(17). P. 19–39.
- Yi X.M., Wang F.L., Qin W.J., Yang X.J., Yuan J.L. // Int. J. Nanomedicine. 2014. V. 9. № 1. P. 1347–1365.
- Vonwil D., Christensen J., Fischer S., Ronneberger O., Shastri V.P. // Mol. Imaging Biol. 2013. V. 16. № 3. P. 350–361.
- Sato K., Watanabe R., Hanaoka H., Harada T., Nakajima T., Kimb I., Paik C.H., Choyke P.L., Kobayashi H. // Mol. Oncology. 2014. V. 8. № 3. P. 620–632.
- Dobosz M., Strobel S., Stubenrauch K.-G., Osl F., Scheuer W. // J. Biomed. Optics. 2014. V. 19. № 1. P. 16022.
- Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.Iu., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 4. P. 1243–1248.
- Ilyushin D.G., Haertley O.M., Bobik T.V., Shamborant O.G., Surina E.A., Knorre V.D., Masson P., Smirnov I.V., Gabibov A.G., Ponomarenko N.A. // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 1(16). P. 73–84.
- Kobayashi H., Choyke P.L. // Acc. Chem. Res. 2011. V. 44. № 2. P. 83–90.
- Zhegalova N.G., He S., Zhou H., Kim D.M., Berezin M.Y. // Contrast Media Mol. Imaging. 2014. V. 9. № 5. P. 355–362.
- Moin K., Sameni M., Victor B.C., Rothberg J.M., Mattingly R.R., Sloane B.F. // Methods Enzymol. 2012. V. 506. P. 175–194.
- Hama Y., Urano Y., Koyama Y., Kamiya M., Bernardo M., Paik R.S., Shin I.S., Paik C.H., Choyke P.L., Kobayashi H. // Cancer Res. 2007. V. 67. № 6. P. 2791–2799.
- Akers W.J., Xu B., Lee H., Sudlow G.P., Fields G.B., Achilefu S., Edwards W.B. // Bioconjugate Chem. 2012. V. 23. № 3. P. 656–663.
- Vinita A.M., Sano K., Yu Z., Nakajima T., Choyke P.L., Ptaszek M., Kobayashi H. // Bioconjugate Chem. 2012. V. 23. № 8. P. 1671–1679.
- Springa B.Q., Abu-Yousifa A.O., Palanisamia A., Rizvia I., Zhenga X., Maia Z., Anbila S., Searsa R. B., Mensaha L.B., Goldschmidt R., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 10. P. E933–E942.
- Ponomarenko N.A., Vorobiev I.I., Alexandrova E.S., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Khaidukov S.V., Avalle B., Karavanov A., Morse H.C. 3rd, Thomas D. // Biochemistry. 2006. V. 45. № 1. P. 324–330.
- Karnovsky M.J., Roots L. // J. Histochem. Cytochem. 1964. V. 12. P. 219–221.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. P. 88–95.
- Ponomarenko N.A., Pillet D., Paon M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Adenier H., Avalle B., Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Thomas D., et al. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 50. P. 14598–14609.
- Voss E.W., Workman C.J., Mummert M.E. // Biotechniques. 1996. V. 20. № 2. P. 286–291.
- Sano K., Mitsunaga M., Nakajima T., Choyke P.L., Kobayashi H. // Breast Cancer Res. 2012. V. 14. № 2. R61.

УДК 577.112.6

Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, действующие на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, замедляют пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29

Е. Н. Люкманова^{1,2*}, М. А. Шулепко^{1,2}, М. Л. Бычков^{1,2}, З. О. Шенкарев^{1,2},
А. С. Парамонов^{1,2}, А. О. Чугунов^{1,2}, А. С. Арсеньев^{1,3}, Д. А. Долгих^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы

³Московский физико-технический институт (Государственный университет), 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2014

РЕФЕРАТ Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, принадлежащие семейству Ly-6/uPAR, секретируются различными клетками, включая эпителиальные и иммунные. Эти белки действуют как ауто/паракринные гормоны, регулирующие рост и дифференцировку кератиноцитов, а также участвуют в контроле воспалительных процессов и злокачественной трансформации клеток. Предполагаемой мишенью SLURP-1 и SLURP-2 являются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAХР) типа $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ соответственно. Детальные молекулярные механизмы, лежащие в основе действия SLURP-1 и SLURP-2, остаются в настоящее время не охарактеризованными. SLURP-2 – один из наименее изученных белков семейства Ly-6/uPAR. В представленной работе разработаны система продукции SLURP-2 в клетках *Escherichia coli* и протокол ренатурации белка из цитоплазматических телец включения. Получены миллиграммовые количества рекомбинантного SLURP-2 и его ¹³C-¹⁵N-меченого аналога. Рекомбинантный белок охарактеризован методом ЯМР-спектроскопии, построена модель пространственной структуры SLURP-2. На клетках колоректальной аденокарциномы человека HT-29, экспрессирующих nAХР только типа $\alpha 7$, проведено сравнительное исследование действия рекомбинантных белков SLURP-1 и SLURP-2. Показано, что SLURP-1 и SLURP-2 оказывают антипролиферативный эффект, вызывая значительное снижение популяции клеток в течение 48 ч, при этом методами флуоресцентной микроскопии не выявлено ни апоптотической, ни некротической гибели клеток. Полуэффективные концентрации (EC_{50}) составили ~ 0.1 и 0.2 нМ для SLURP-1 и SLURP-2 соответственно. Максимальный эффект (~ 54 и 63% живых клеток относительно контроля) наблюдали при концентрации SLURP-1 и SLURP-2, равной 1 мкМ. Полученные данные указывают на nAХР типа $\alpha 7$ как на главный рецептор, ответственный за антипролиферативный эффект белков SLURP в эпителиальных клетках человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериальная экспрессия, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, ренатурация, рак кишечника, Lynx.

СОКРАЩЕНИЯ vd-Lynx1 – водорастворимый домен Lynx1 человека; nAХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAХР) – лигандозависимый ионный канал, обнаруженный как в центральной и периферической нервной системе, так и во многих других тканях человека, в том

числе эпителии [1, 2]. Несколько лет назад у вышших животных были обнаружены белки, принадлежащие семейству Ly-6/uPAR и модулирующие действие nAХР (Lynx1, Lynx2, Lypd6, SLURP-1, SLURP-2) [3–7]. Консервативное расположение

остатков Cys (рис. 1), образующих дисульфидные связи, указывает на гомологию пространственной структуры белков Lynx и SLURP с трехпетельной структурой α -нейротоксинов из яда змей, высокоэффективных и специфичных ингибиторов nAChR [8].

Секретируемые белки SLURP-1 и SLURP-2 обнаружены во многих тканях человека, включая эпителий и клетки иммунной и нервной системы [5, 6, 9, 10]. Белки SLURP влияют на рост, миграцию и дифференцировку клеток эпителия, а также участвуют в контроле воспаления и опухолевого роста [6, 11, 12]. На линии кератиноцитов Het1A показано, что SLURP-1 обладает антипролиферативной активностью и способствует апоптотической гибели клеток [11], в то же время SLURP-2 ускоряет рост кератиноцитов, замедляя их дифференцировку и ослабляя ответ на проапоптотические сигналы [6]. Кроме того, белки SLURP регулируют заживление ран на коже и слизистых оболочках [13] и принимают участие в защите клеток кожи от онкогенной трансформации, вызванной нитрозаминами – производными никотина [14, 15]. Вероятно, SLURP-1 и SLURP-2 играют роль ауто/паракринных регуляторов, а их эффекты опосредованы взаимодействием с nAChR, представленными на поверхности клеточной мембраны кератиноцитов и иммунных клеток [10, 16]. Предполагаемой мишенью действия SLURP-1 и SLURP-2 являются nAChR типа $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ соответственно [6, 11]. Недавно в клетках колоректальной аденокарциномы человека HT-29 обнаружили экспрессию SLURP-1 и показали, что уровень эндогенной продукции SLURP-1 в этих клетках значительно снижается при обработке никотином [17]. В то же время клетки HT-29 могут экспрессировать только рецепторы nAChR типа $\alpha 7$ [18].

В настоящее время структурно-функциональные свойства белков человека SLURP-1 и SLURP-2, а также механизм их действия изучены недостаточно. Основные проблемы в изучении SLURP-1 и SLURP-2 связаны с невозможностью получить достаточное количество препаратов белков из природных источников, а также со сложностью продукции рекомбинантных белков с нативной последовательностью и пространственной структурой. Вследствие этого, большая часть опубликованных ранее результатов получена с использованием гибридных конструкций, кодирующих не только белок SLURP, но и дополнительные полипептиды, которые могут значительно влиять на активность препарата. Например, SLURP-2 изучали с использованием слитой с белком SUMO конструкции (общая масса белка 22 кДа, из которых только ~ 8 кДа приходится на SLURP-2) [6].

В представленной работе впервые разработана эффективная система продукции белка SLURP-2 в клетках *E. coli* в виде цитоплазматических телец включения и предложен протокол его ренатурации. Полученный рекомбинантный аналог отличается от природного белка одним дополнительным остатком (N-концевой Met). Высокий выход (~ 5 мг ренатурированного белка с 1 л бактериальной культуры) позволил получить миллиграммовые количества рекомбинантного белка и его ^{13}C - ^{15}N -меченого варианта. Разработка подобной системы открывает новые перспективы в структурно-функциональных исследованиях SLURP-2. Так, нами показан значительный антипролиферативный эффект SLURP-1 и SLURP-2 на клетки линии HT-29. Это позволяет предположить, что главную роль в передаче сигналов к замедлению роста эпителиальных клеток под действием белков SLURP играет nAChR типа $\alpha 7$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование и бактериальная продукция SLURP-2

Ген *slurp-2*, кодирующий 75 аминокислотных остатков белка SLURP-2 человека (рис. 1A), был сконструирован из синтетических перекрывающихся олигонуклеотидов с использованием ПЦП и с учетом частоты встречаемости кодонов в *Escherichia coli* (ЗАО «Евроген», Москва). Ген *slurp-2* был клонирован в экспрессионный вектор pET-22b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированные вектором pET-22b(+)/*slurp-2* культивировали при 37°C на среде ТВ (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г K_2HPO_4 , 12.5 г K_2HPO_4 на 1 л среды, pH 7.4) в ферментере Bioflow 3000 (New Brunswick Scientific) в условиях автоматического поддержания относительного содержания кислорода в системе не менее 30% от максимально достижимого. Экспрессию гена *slurp-2* индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0.05 mM при оптической плотности клеточной культуры 1.0 о.е. После индукции клетки культивировали в течение 8 ч.

Для продукции ^{13}C - ^{15}N -меченого аналога SLURP-2 1 л клеточной культуры, предварительно выращенной на среде ТВ в колбах до клеточной плотности 1.0 о.е., центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g. Клеточный осадок стерильно ресуспендировали в 1 л минимальной среды M9 (6 г Na_2HPO_4 , 3 г KH_2PO_4 , 0.5 г NaCl, 2 г NH_4Cl , 240 мг безводного MgSO_4 , 11 мг CaCl_2 , 3 г глюкозы, 2 мг дрожжевого экстракта, 200 мкл 5%-ного тиаминоклорида на 1 л среды, pH 7.4), содержащей в качестве источников глюкозы

и азота ^{13}C -глюкозу и $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ (CIL) соответственно. Индукцию и дальнейшее выращивание проводили так же, как на среде ТВ.

Очистка и ренатурация рекомбинантного SLURP-2

Тельца включения, содержащие SLURP-2, выделяли и отмывали согласно протоколам, описанным ранее для SLURP-1 [19]. Отмытые тельца включения ресуспендировали в 30 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.7, содержащем 8 М мочевины, 0.4 М сульфата натрия, 0.15 М тетрагидрата натрия из расчета 10 мл буфера на 1 г тельца включения. Суспензию дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 1 мин и оставляли на 8 ч при слабом перемешивании. Затем суспензию центрифугировали при 36000 *g* и 4°C в течение 30 мин, супернатант разводили в 10 раз 2 М мочевиной. После этого препарат сульфитированного SLURP-2 наносили на колонку с DEAP-сферонит-ОН (совместная разработка ГНИИ ОЧБ, Санкт-Петербург и ИБХ РАН), предварительно уравновешенную буфером А (30 мМ Трис-НСl, рН 8.0). После нанесения белка колонку последовательно промывали буфером А, буфером А с добавлением 1 М NaCl, буфером А с добавлением 8 М мочевины. Сульфитированный SLURP-2 элюировали буфером А с добавлением 8 М мочевины и 0.5 М NaCl. Во фракции, содержащие SLURP-2, добавляли 1000-кратный (по отношению к белку) молярный избыток ДТТ. Восстановленный SLURP-2 очищали с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300, 10×250 мм, Phenomenex). SLURP-2 элюировали градиентом ацетонитрила (20–45%) в течение 40 мин в присутствии 0.1% ТФУ. Препарат восстановленного SLURP-2 лиофилизовали и растворяли в буфере для ренатурации, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 9.0, 2 М мочевины, 0.5 М L-аргинин, 2 мМ GSH и 2 мМ GSSG, до конечной концентрации белка 0.1 мг/мл. Ренатурацию проводили при 4°C в течение 3 сут. Анализ и очистку SLURP-2 после ренатурации проводили с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300, 4.6×250 мм, Phenomenex). Ренатурированный препарат SLURP-2 лиофилизовали.

ЯМР-спектроскопия и моделирование структуры SLURP-2

ЯМР-спектры ^{13}C - ^{15}N -меченого и немеченого SLURP-2 (концентрация образцов 0.5 мМ) получали при температуре 30°C на спектрометре AVANCE-700 (Bruker).

Для моделирования структуры SLURP-2 в качестве шаблона использовали белок вд-Lynx1 (PDB 2L03). Выравнивание аминокислотных последовательностей было построено на веб-сервере Clustal

(www.clustal.org). Модель построена при помощи программы Modeller V8.2 [20].

Работа с клеточной линией HT-29

Клетки колоректальной аденокарциномы HT-29 (НИИ Цитологии РАН, Санкт-Петербург) поддерживали в среде RPMI1640 (ООО «ПанЭко», Москва) с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки (Nucclone, Thermo Fisher Scientific). Клетки поддерживали в гумидифицированной атмосфере (37°C , 5% CO_2) и пересевали каждые 48 ч.

За 16 ч до эксперимента клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты из расчета 10^4 клеток на лунку. После адсорбции к клеткам добавляли препараты SLURP-1 и SLURP-2 (рекомбинантный препарат SLURP-1 получен согласно протоколу, описанному в [19]). Все препараты разводили в культуральной среде. Клетки инкубировали с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 в течение 48 ч. Пролиферацию клеток изучали с помощью реagenta WST-1 (water soluble tetrazolium salt 1, Santa Cruz). WST-1 растворяли в 20 мМ HEPES (рН 7.4), реактив для транспорта электронов 1-м PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate, Santa Cruz) растворяли в деионизованной воде, после чего растворы смешивали и добавляли в лунки планшета из расчета 0.5 мМ WST-1 и 20 мкМ 1-м PMS на лунку. После инкубации в течение 3 ч с WST-1 жизнеспособность клеток оценивали спектрофотометрически по поглощению при 450 нм с выравниванием фона при 655 нм (спектрофотометр BioRad 680, BioRad Laboratories).

Флуоресцентная микроскопия

Морфологию ядер опухолевых клеток изучали с использованием красителя Hoechst 33342 (Sigma). Некротическую гибель клеток определяли, окрашивая клетки йодидом пропидия (Sigma). Клетки обрабатывали так же, как и при исследовании пролиферации, но по истечении времени инкубации с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 к клеткам добавляли 1 мкМ красителя Hoechst 33342 и 0.5 мкМ йодида пропидия, после чего анализировали ядра с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-f (Nikon Corp.) с использованием $\times 40$ объектива.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальная продукция и ренатурация SLURP-2

Ранее на примере «слабого» токсина WTX из яда кобры *Naja kaouthia* [21], водорастворимого домена белка человека Lynx1 (вд-Lynx1), модулирующего работу nAXP [22], и белка человека SLURP-1 [19] было

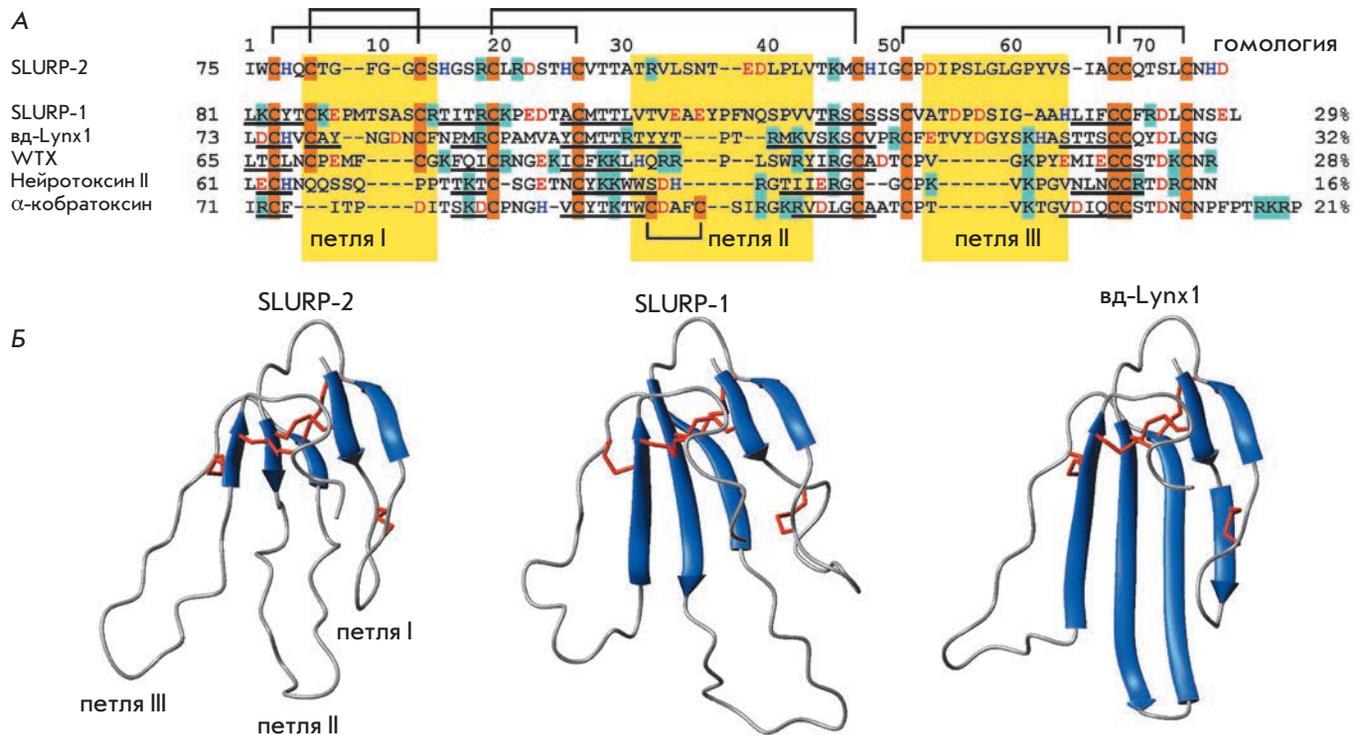


Рис. 1. Сравнение структур трехпетельных белков семейства Ly-6/uPAR. **А** — сравнение аминокислотных последовательностей SLURP-1, SLURP-2, вд-Lynx1 человека, нейротоксина WTX из *Naja kaouthia* и нейротоксина II из *N. oxiana* и α-кобротоксина из *N. kaouthia*. Заряженные остатки и остатки Cys выделены цветом, дисульфидные связи показаны скобками. Фрагменты белков, образующие β-тяжи, подчеркнуты. Гомология аминокислотной последовательности между SLURP-2 и другими трехпетельными белками рассчитана в программе CLUSTAL W2. **Б** — сравнение модели структуры SLURP-2 с пространственной структурой SLURP-1 (Шенкарев и др. в печати, PDB 2MUO) и вд-Lynx1 ([23] PDB 2L03)

показано, что оптимальным способом получения рекомбинантных трехпетельных белков, содержащих пятую дисульфидную связь в первой петле (рис. 1А), является продукция в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией. Рекомбинантный белок SLURP-2 также получили с применением этого подхода. Выход белка SLURP-2 с восстановленными дисульфидными связями составил около 40 и 15 мг на 1 л бактериальной культуры на «богатой» (ТВ) и минимальной (М9) средах соответственно. Однако протоколы ренатурации, разработанные ранее для других трехпетельных белков [19, 21, 22], оказались малоэффективными для ренатурации SLURP-2.

С целью оптимизации условий ренатурации SLURP-2 были опробованы различные концентрации восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона (4 : 1 mM, 4 : 2 mM, 2 : 2 mM, 3 : 0.3 mM) и значения pH (7.0–9.0) ренатурирующего буфера (рис. 2А,Б). При оптимальных условиях (см.

«Экспериментальную часть») выход ренатурированного SLURP-2 и его ¹³C-¹⁵N-меченого аналога составил 4.6 и 3 мг с 1 л бактериальной культуры соответственно. Гомогенность препарата ренатурированного SLURP-2 была подтверждена с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 2В), ВЭЖХ (рис. 2А) и масс-спектрометрии (рис. 2Г). Молекулярная масса рекомбинантного белка составила (8146 Да), что с учетом ошибки эксперимента соответствует теоретически рассчитанной массе SLURP-2 (8145 Да) с пятью замкнутыми дисульфидными связями и дополнительным N-концевым остатком метионина. Формирование дисульфидных связей также подтверждено с помощью реактива Элмана.

ЯМР-спектры и моделирование структуры SLURP-2

Анализ корреляционного 2D ¹H-¹⁵N-ЯМР-спектра рекомбинантного SLURP-2 (рис. 3А) подтвердил гомогенность и чистоту полученного препарата.

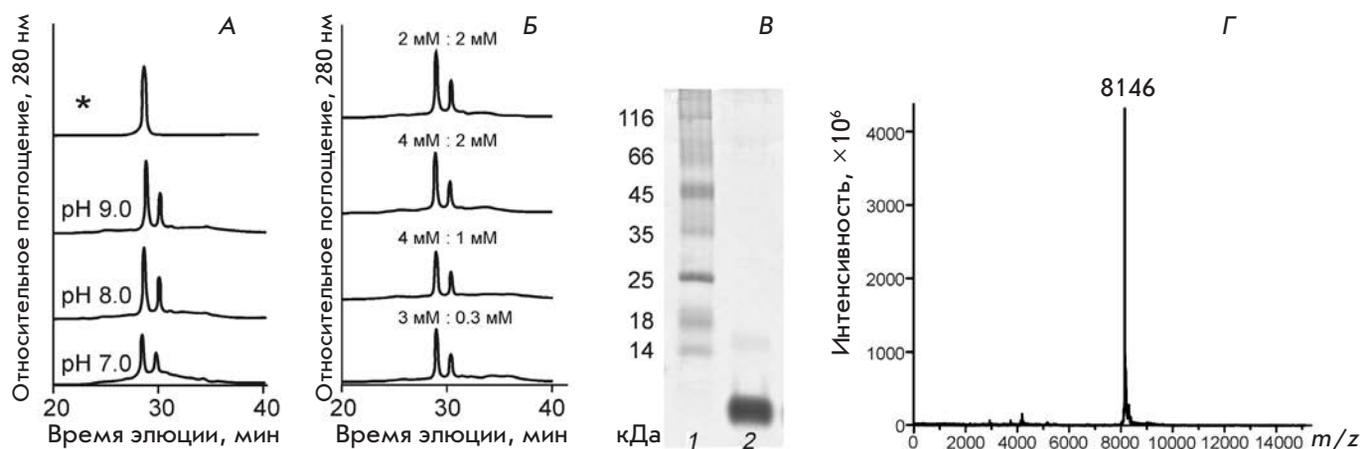


Рис. 2. Анализ рекомбинантного препарата SLURP-2. А, Б – эффективность ренатурации SLURP-2 зависит от значения pH ренатурирующего буфера (А) и концентраций восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона (Б). Звездочкой обозначен пик, соответствующий очищенному препарату ренатурированного SLURP-2. В – электрофоретический анализ SLURP-2, полученного из телец включения, после ренатурации и очистки с помощью ВЭЖХ. Г – масс-спектрометрический анализ ренатурированного SLURP-2

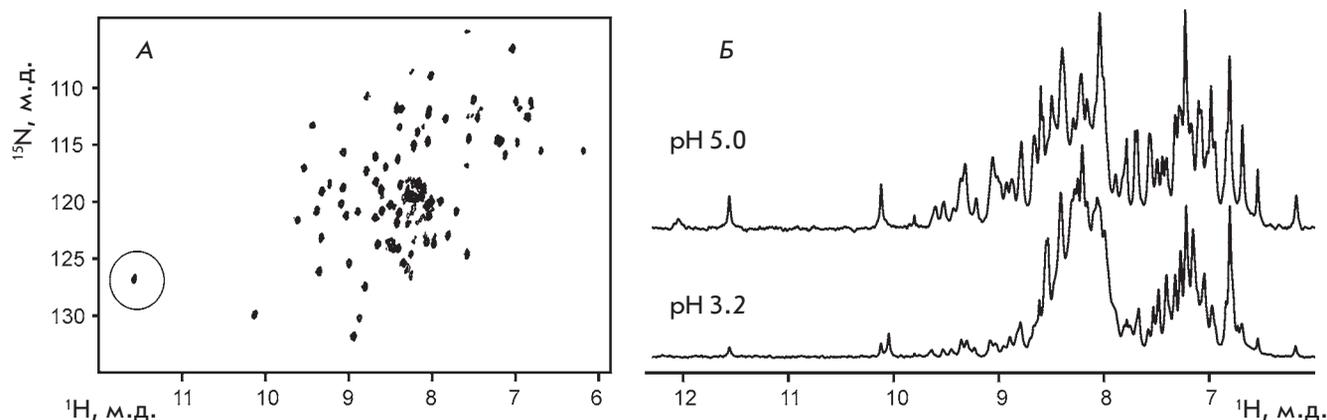


Рис. 3. Анализ рекомбинантного препарата SLURP-2 методом ЯМР-спектроскопии. А – 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-спектр 0.5 мМ ^{13}C - ^{15}N -меченого SLURP-2 (30°C, pH 5.0). Б – фрагменты 1D ^1H -спектров немеченого SLURP-2 при pH 5.0 и 3.2

Значительная дисперсия $^1\text{H}^{\text{N}}$ -сигналов основной цепи (от 7 до 9.7 м.д.) указала на наличие β -структурных регионов в белке. В ЯМР-спектрах наблюдался один набор сигналов, что свидетельствует об отсутствии конформационной гетерогенности, обусловленной *цис-транс*-изомеризацией пептидных связей Xxx-Pro. Этим белок SLURP-2 схож с вд-Lynx1, имеющим одну структурную форму в растворе [23], и отличается от SLURP-1, который в растворе находится в виде двух равно заселенных структурных форм, возникающих из-за «медленной» (по шкале ЯМР)

изомеризации пептидной связи Tyr39-Pro40 [19]. В этой связи следует отметить, что, согласно анализу аминокислотной последовательности, SLURP-2 имеет большую гомологию с вд-Lynx1, чем с белком SLURP-1 (32 и 29% соответственно, рис. 1А). Интересно, что белки Lynx1 и SLURP-2 человека являются продуктами альтернативного сплайсинга одного гена, находящегося на хромосоме 8.

На схожесть структуры SLURP-2 и вд-Lynx1 указывает также присутствие в спектре ЯМР характерного $^1\text{H}^{\text{N}}$ -сигнала, смещенного в слабое поле

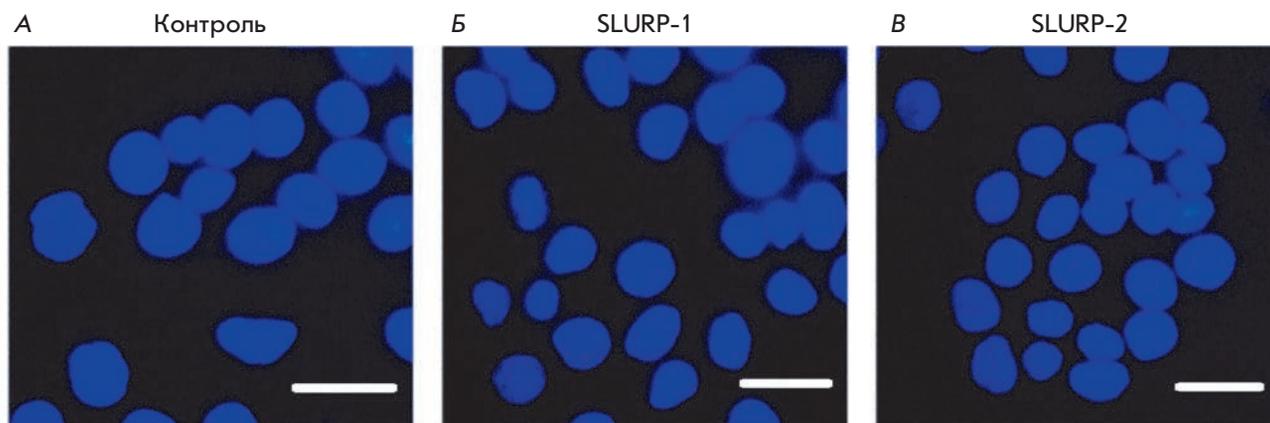


Рис. 4. Влияние препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на морфологию ядер клеток колоректальной аденокарциномы HT-29. А – клетки без добавления белков SLURP. Б, В – клетки в присутствии 1 мкМ SLURP-1 и 1 мкМ SLURP-2 соответственно после инкубации в течение 48 ч. Ядра клеток прокрашены красителями Hoechst 33342 и йодидом пропидия. Масштаб линейки 10 мкм

(11.6 м.д.) (обведен кружком, *рис. 3А*). Согласно опубликованной пространственной структуре *vd-Lynx1* [23], значительное смещение сигнала HN-группы остатка Asn15 в слабое поле вызвано образованием водородной связи с боковой цепью His4. В структуре SLURP-2 подобная водородная связь может быть образована боковой цепью His4 и HN-группой основной цепи His14. При изменении значения pH препарата SLURP-2 от 5 до 3 значительно уменьшалась интенсивность сигналов в слабopольном регионе (8.7–9.7 м.д.) ¹H-спектра ЯМР с одновременным увеличением интенсивности сигналов в районе 8 м.д. (*рис. 3Б*). Это свидетельствовало о частичном разрушении пространственной структуры белка, сопровождаемом переходами отдельных фрагментов из β-структурной конформации в конформацию неупорядоченного клубка. Схожую pH-индуцированную денатурацию ранее наблюдали для *vd-Lynx1*, но не SLURP-1 (Шенкарев и др., неопубликованные данные).

Учитывая эти косвенные признаки сходства пространственной структуры, на основе известной структуры белка *vd-Lynx1* была построена модель SLURP-2 (*рис. 1Б*). Эта модель демонстрирует характерную трехпетельную организацию и β-структурное ядро, образованное пятью тяжами, формирующими два антипараллельных β-листа.

Исследование активности препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на клеточной линии HT-29

Инкубация клеток колоректальной аденокарциномы HT-29 с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч приводила к значи-

тельному уменьшению количества клеток – до $54 \pm 2\%$ и $63 \pm 2\%$ относительно контроля соответственно. Анализ морфологии ядер клеток с помощью флуоресцентной микроскопии показал, что ни SLURP-1, ни SLURP-2 не вызывали апоптотической или некротической гибели клеток HT-29 (*рис. 4*). Так, уменьшение плотности клеток не сопровождалось изменением морфологии большинства клеточных ядер по сравнению с контролем, а окрашивание йодидом пропидия не выявило увеличения фракции некротизированных клеток ($3 \pm 1\%$ в контроле и в лунках, содержащих 1 мкМ SLURP-1 и SLURP-2). Таким образом, наблюдаемые эффекты SLURP-1 и SLURP-2 связаны с замедлением пролиферации клеток HT-29.

Сравнительный анализ с помощью теста WST-1 выявил, что SLURP-1 и SLURP-2 значительно ингибируют рост опухолевых клеток HT-29. Анализ кривой доза–эффект показал, что ингибирующий эффект SLURP-1 и SLURP-2 зависит от концентрации белков (*рис. 5*). Полуэффективная концентрация (EC_{50}) для SLURP-1 составила ~ 0.1 нМ и ~ 0.2 нМ для SLURP-2. Максимальный ингибирующий эффект достигался при концентрации белков, равной примерно 1 мкМ (*рис. 5*).

Показано, что клетки HT-29 содержат мРНК, кодирующие только α4-, α5-, α7- и β1-субъединицы nAXP [18]. Так как из этого набора только α7-субъединицы способны образовывать функциональные рецепторы [1], предположили, что α7 – единственный рецептор семейства nAXP, представленный в клетках HT-29 [18]. Вероятно, именно этот рецептор участвует в регуляции высвобождения

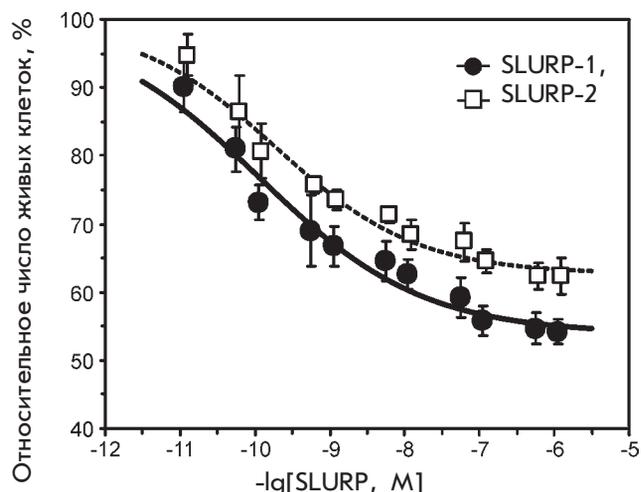


Рис. 5. Влияние препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29 по данным WST-1-теста. Приведены данные трех независимых экспериментов. Полученные данные (число живых клеток в % от контроля) аппроксимированы уравнением Хилла ($y = A1 + (100\% - A1)/(1 + ([\text{SLURP}]/\text{EC}_{50})^{\text{nH}})$). Рассчитанные параметры EC_{50} , nH и A1 составили 0.11 ± 0.05 нМ, 0.4 ± 0.1 и $54 \pm 2\%$ для SLURP-1 и 0.19 ± 0.07 нМ, 0.5 ± 0.1 и $63 \pm 2\%$ для SLURP-2

интерлейкина-8 клетками HT-29 под воздействием никотина [18]. Основываясь на этих данных, мы можем предположить, что мишенью белков SLURP-1 и SLURP-2 в клетках HT-29 является nAHP $\alpha 7$ -типа.

Ранее в экспериментах по конкуренции с ^3H -никотином и ^3H -эпибатидином на кератиноцитах линии Het1A, которые, в отличие от HT-29, экспрессируют nAHP различных типов [24], было выдвинуто предположение, что мишенью SLURP-1 является $\alpha 7$ -nAHP, а SLURP-2 действует преимущественно на $\alpha 3\beta 2$ -nAHP [6, 11]. При этом SLURP-1 замедляет пролиферацию кератиноцитов [11], а SLURP-2 ее усиливает [6]. Таким образом, можно предположить,

что ингибирующий эффект SLURP-1 и SLURP-2, наблюдаемый на клетках Het1A и HT-29, опосредован взаимодействием с $\alpha 7$ -nAHP. Активирующий эффект SLURP-2 на кератиноциты был, по-видимому, обусловлен его взаимодействием с $\alpha 3\beta 2$ -nAHP. Меньшая по сравнению со SLURP-1 антипролиферативная активность SLURP-2 на клетках HT-29 связана, возможно, с меньшим сродством этого белка к $\alpha 7$ -nAHP.

ВЫВОДЫ

В представленной работе разработана эффективная система продукции малоизученного белка человека SLURP-2, получены миллиграммовые количества рекомбинантного препарата и его ^{13}C - ^{15}N -меченого аналога. Рекомбинантный SLURP-2 отличается от природного белка наличием дополнительного N-концевого остатка Met. Эта система открывает новые возможности для проведения структурно-функциональных исследований SLURP-2, в том числе с помощью методов сайт-направленного мутагенеза. Впервые охарактеризован антипролиферативный эффект белков SLURP-1 и SLURP-2 на линии клеток колоректальной аденокарциномы человека HT-29, выдвинуто предположение, что этот эффект опосредован взаимодействием с nAHP типа $\alpha 7$. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на роль никотинового ацетилхолинового рецептора и его отдельных подтипов в регуляции роста эпителиальных клеток. ●

*Разработка системы рекомбинантной продукции SLURP-2, получение рекомбинантного препарата SLURP-2 и структурно-функциональные исследования SLURP-2 выполнены при финансовой поддержке РФФ (соглашение № 14-14-00255).
 Продукция рекомбинантного препарата SLURP-1 и его функциональные исследования выполнены при поддержке РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология») и РФФИ (грант № 12-04-01639-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Papke R.L. // Biochem. Pharmacol. 2014. V. 89. № 1. P. 1–11.
2. Sharma G., Vijayaraghavan S. // J. Neurobiol. 2002. V. 53. № 4. P. 524–534.
3. Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W., Sánchez R., Sali A., Role L.W., Heintz N. // Neuron. 1999. V. 23. № 1. P. 105–114.
4. Tekinay A.B., Nong Y., Miwa J.M., Lieberam I., Ibanez-Tallon I., Greengard P., Heintz N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4477–4482.
5. Chimienti F., Hogg R.C., Plantard L., Lehmann C., Brakch N., Fischer J., Huber M., Bertrand D., Hohl D. // Hum. Mol. Genet. 2003. V. 12. P. 3017–3024.
6. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Webber R.J., Grando S.A. // J. Cell Physiol. 2006. V. 208. P. 238–245.
7. Darvas M., Morsch M., Racz I., Ahmadi S., Swandulla D., Zimmer A. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2009. V. 19. P. 670–681.
8. Tsetlin V., Utkin Y., Kasheverov I. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 78. P. 720–731.
9. Moriwaki Y., Watanabe Y., Shinagawa T., Kai M., Miyazawa M., Okuda T., Kawashima K., Yabashi A., Waguri S., Misawa H. // Neurosci. Res. 2009. V. 64. P. 403–412.
10. Moriwaki Y., Yoshikawa K., Fukuda H., Fujii Y.X., Misawa H., Kawashima K. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 2365–2368.

11. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Webber R.J., Grando S.A. // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. P. 1236–1241.
12. Chernyavsky A.I., Galitovskiy V., Shchepotin I.B., Grando S.A. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 609086.
13. Chernyavsky A.I., Kalantari-Dehaghi M., Phillips C., Marchenko S., Grando S.A. // *Wound Repair Regen.* 2012. V. 20. № 1. P. 103–113.
14. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci.* 2007. V. 80. P. 2243–2247.
15. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. № 8. P. 1315–1319.
16. Chernyavsky A.I., Marchenko S., Phillips C., Grando S.A. // *Dermatoendocrinol.* 2012. V. 4. № 3. P. 324–330.
17. Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., Nordgren S., Delbro D.S. // *Auton Neurosci.* 2009. V. 148. P. 97–100.
18. Summers A.E., Whelan C.J., Parsons M.E. // *Life Sci.* 2003. V. 72. № 18–19 P. 2091–2094.
19. Шулепко М.А., Люкманова Е.Н., Парамонов А.С., Лобас А.А., Шенкарев З.О., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И., Долгих Д.А., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. № 2. С. 276–285.
20. Webb B., Sali A. // *Curr. Protocols Bioinform.* 2014. V. 47. № 5–6. P. 1–32.
21. Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Тихонов Р.В., Шенкарев З.О., Парамонов А.С., Вульфсон А.Н., Кашеверов И.Е., Устич Т.Л., Уткин Ю.Н., Арсеньев А.С. и др. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 10. С. 1142–1149.
22. Шулепко М.А., Люкманова Е.Н., Кашеверов И.Е., Долгих Д.А., Цетлин В.И., Кирпичников М.П. // *Биоорганическая химия.* 2011. Т. 37. № 5. С. 609–615.
23. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Mineev K.S., D'Hoedt D., Kasheverov I.E., Filkin S., Janickova H., Dolezal V., Dolgikh D.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10618–10627.
24. Grando S.A. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1997. V. 2. № 1. P. 41–48.

УДК 577.352

Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов

С. С. Ефимова*, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

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

*E-mail: ssefimova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2014

РЕФЕРАТ В работе исследована роль мембранных компонентов, стерина, фосфолипидов и сфинголипидов в процессах формирования и функционирования ион-проницаемых нанопор, образуемых противогрибковыми макролидами, амфотерицином В, нистатином и филипином, в модельных мембранах. В качестве инструмента для выяснения молекулярных механизмов использованы дипольные модификаторы, флавоноиды и стироловые красители. Показано, что введение в мембраноомывающие растворы дипольных модификаторов приводит к изменению проводимости одиночных каналов и равновесного трансмембранного тока, индуцированного полиеновыми антибиотиками в стеринсодержащих фосфолипидных бислоях. Установлено, что проводимость одиночных амфотерициновых каналов зависит от дипольного потенциала мембраны. Использование набора различных фосфолипидов, стерина и полиеновых антибиотиков позволило заключить, что геометрия фосфолипидной молекулы, наличие двойных связей в 7- и 22-положениях молекулы стерина, число сопряженных двойных связей и наличие аминокислоты в молекуле антибиотика определяют стабильность полиен-липидных комплексов, образующих проводящие трансмембранные поры. Представленные в работе экспериментальные и литературные данные позволяют сделать предположение о связи каналообразующей активности полиеновых антибиотиков с физико-химическими свойствами обогащенных полиеновыми макролидами упорядоченных мембранных областей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА плоские липидные бислои, полиеновые антибиотики, стерин, стироловые красители, сфинголипиды, флавоноиды, фосфолипиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМВ – амфотерицин В; НС – нистатин; ФЛ – филипин; ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДФФС – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин; ЛР-ДПФЭ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-*N*- (лиззаминродамин); Хол – холестерин; Эрг – эргостерин; ДХол – 7-дегидрохолестерин; Стигм – стигмастерин; СФС – *N*-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae*; СМ – сфингомиелин из мозга свиней; СЭС – *N*-стеароил-*D*-эритро-сфинганин.

ВВЕДЕНИЕ

Макролидные полиеновые антибиотики – одни из самых эффективных препаратов, применяемых при грибковых инфекциях, глубоких системных микозах, они широко используются в клинической медицине уже много десятилетий. Интерес к полиеновым макролидам обусловлен также их противоопухолевой и противовирусной активностью [1–3]. Несмотря на большое число побочных эффектов, таких, как нефротоксичность, анемия, сердечная аритмия [4, 5], полиеновые макролиды остаются препаратами выбора для лечения пациентов с иммунодефицитным статусом [6, 7]. Современные фар-

мацевтические технологии разработки препаратов на основе полиеновых макролидов направлены на снижение действующей концентрации антибиотика без ущерба для его терапевтической эффективности.

Основными представителями класса неароматических макролидных полиеновых антибиотиков являются амфотерицин В (АМВ) [8], нистатин (НС) [9, 10] и филипин (ФЛ) [11]. В состав лактонного кольца молекулы амфотерицина В входят 38 углеродных атомов (рис. 1). Гидрофильная и гептаеновая цепи в макролактонном кольце молекулы АМВ представлены углеродными атомами C_1-C_{15} и $C_{20}-C_{33}$ соответ-

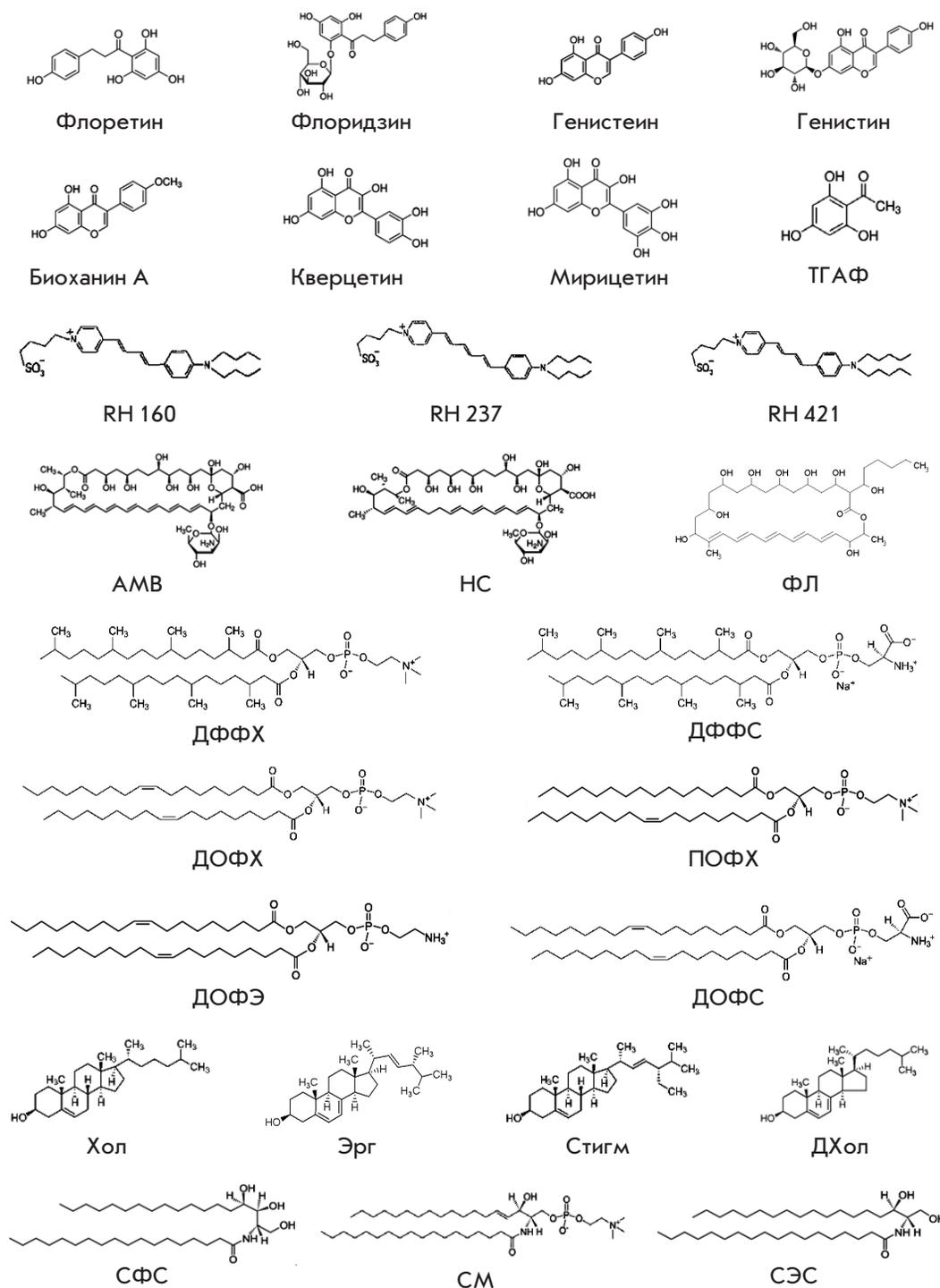


Рис. 1. Химическая структура флавоноидов флоретина, флоридзина, генистеина, генистина, биоханина А, кверцетина, мирицетина и ТГАФ, стироловых красителей RH 160, RH 237 и RH 421, полиенов АМВ, НС и ФЛ, фосфолипидов ДФФХ, ДФФС, ДОФХ, ПОФХ, ДОФЭ и ДОФС, стерина Хол, Эрг, ДХол и Стигм, сфинголипидов СФС, СМ и СЭС

ственно. Эти цепи располагаются параллельно друг другу. Гептаеновая цепочка $C_{20}-C_{33}$ – жесткая система, состоящая из семи двойных связей. В гидрофильной цепи молекулы АМВ содержатся гидроксильные и карбонильные группы. Гидроксильные группы в гидрофильной области молекулы расположены в одной плоскости. В положениях 6 и 19 находятся

карбоксильная группа и остаток микоамина соответственно. Еще одна гидроксильная группа локализована в гидрофобной части молекулы в положении 35. Химическая структура молекулы нистатина, относящегося к классу тетраенов, близка к структуре АМВ. Нистатин отличается от АМВ положением гидроксильных групп в гидрофильной цепи и преры-

вистостью системы сопряженных двойных связей, насыщенная связь разделяет хромофор на диеновый и тетраеновый участки. Филиппин относится к классу метилпентаенов, он отличается от АМВ и НС меньшим размером полиенового фрагмента, а также отсутствием аминсахарного остатка [12].

Считается, что клетки-мишени гибнут благодаря способности полиеновых антибиотиков связываться с их плазматическими мембранами, формировать в них трансмембранные поры и нарушать водно-электролитный баланс. Обязательное условие образования пор – наличие стерина в мембранах клеток-мишеней [8, 13, 14]. Несмотря на 40-летнее исследование молекулярных механизмов формирования и функционирования АМВ-канала, его точная молекулярная архитектура все еще находится на стадии обсуждения. Предложены различные модели АМВ-канала, из которых наиболее популярна стерин-зависимая модель, в рамках которой образование канала при двусторонней относительно мембраны добавке антибиотика происходит при ассоциации двух «полупор», образованных полиен-стериновыми комплексами, расположенными в противоположных монослоях [8, 13, 15]. Полупора, имеющая цилиндрическую форму, образуется одинаковым числом (от 7 до 10) молекул антибиотика и стерина, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны. Полость поры выстлана гидрофильными цепочками лактонового кольца. Сквозная трансмембранная пора формируется за счет образования водородных связей между гидроксильными группами молекул АМВ, сосредоточенных во взаимодействующих полупорах [12].

Стерин-зависимая мембранная активность амфотерицина В указывает на то, что терапевтическая эффективность АМВ прежде всего связана с его неодинаковой специфичностью в отношении различных стерина клеточных мембран. Как известно, холестерин (Хол) является основным стерин мембран клеток млекопитающих, а эргостерин (Эрг) – клеток грибов. До сих пор не ясно, обусловлена ли специфичность взаимодействия полиенов с мембранами различных клеток большей стабильностью комплекса АМВ с Эрг по сравнению с Хол или наблюдаемые эффекты опосредованы различным влиянием этих стерина на структурные и динамические свойства мембран [16, 17].

Данные Нейман и соавт. [18, 19] свидетельствуют в пользу первой гипотезы. Более жесткая и удлиненная молекулярная геометрия Эрг по сравнению с Хол облегчает взаимодействие Эрг с молекулой АМВ. Принимая во внимание тот факт, что сила Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий стержнеобразных молекул зависит от их взаимной ориен-

тации и достигает максимума, когда обе молекулы лежат в одной плоскости и параллельны друг другу, π - π -электронное взаимодействие между двойной связью в боковой цепи Эрг и полиеновым хромофором АМВ может быть дополнительной точкой, необходимой для стабилизации правильной ориентации комплекса (рис. 2А,Б) [20]. В случае Хол не только энергия комплексообразования больше (нет двойной связи в боковой цепи молекулы стерина), но также должны быть компенсированы энтропийные потери, связанные с уменьшением конформационной гибкости боковой цепи стерина. Результаты исследования подвижности молекул АМВ и стерина в фосфолипидных бислоях методом 2Н-ЯМР, проведенные Матсумори и соавт. [21], подтвердили гипотезу о более сильном межмолекулярном взаимодействии АМВ с Эрг по сравнению с Хол.

Стерины определяют текучесть мембран и преимущественно локализуются в более упорядоченных мембранных областях – липидных рафтах, что может служить основанием для принятия второй гипотезы. Показано, что АМВ имеет более высокое сродство к стеринсодержащей упорядоченной фазе и, следовательно, может, как и стерины, аккумулироваться в липидных рафтах [17, 22]. Целый ряд работ указывает на увеличение упорядоченности Хол-содержащих мембран в присутствии АМВ и в отсутствие подобного эффекта в случае мембран, включающих Эрг [17, 23, 24].

Кжуб и Багинский [17] показали, что отрицательно заряженная карбоксильная группа (COO^-) в молекуле АМВ смещена в сторону водной фазы по сравнению с протонированной амингруппой (NH_3^+). Авторы предположили, что диполь полярной головы АМВ ($\text{COO}^- \rightarrow \text{NH}_3^+$) стремится ориентироваться параллельно диполям полярных голов фосфатидилхолина и соответственно приводит к росту дипольного потенциала мембраны. Это скачок потенциала, возникающий на границе раздела фаз бислоя–раствор в результате определенной взаимной ориентации диполей мембранных липидов и околомембранной воды [25–27] и играющий существенную роль в регуляции транспорта веществ через мембрану.

Как было отмечено, макролидные полиеновые антибиотики проявляют противогрибковый эффект, связываясь с мембранными стеринами, но при этом информации об участии других мембранных компонентов, в частности фосфолипидов и сфинголипидов, мало. Существует ряд свидетельств в пользу того, что фосфолипиды влияют на активность полиеновых антимикотиков. Согласно опубликованным данным, полиеновые антибиотики способны образовывать трансмембранные поры в бислое и в отсутствие в нем стерина [28–32]. Фуджи и соавт. [33] показали,

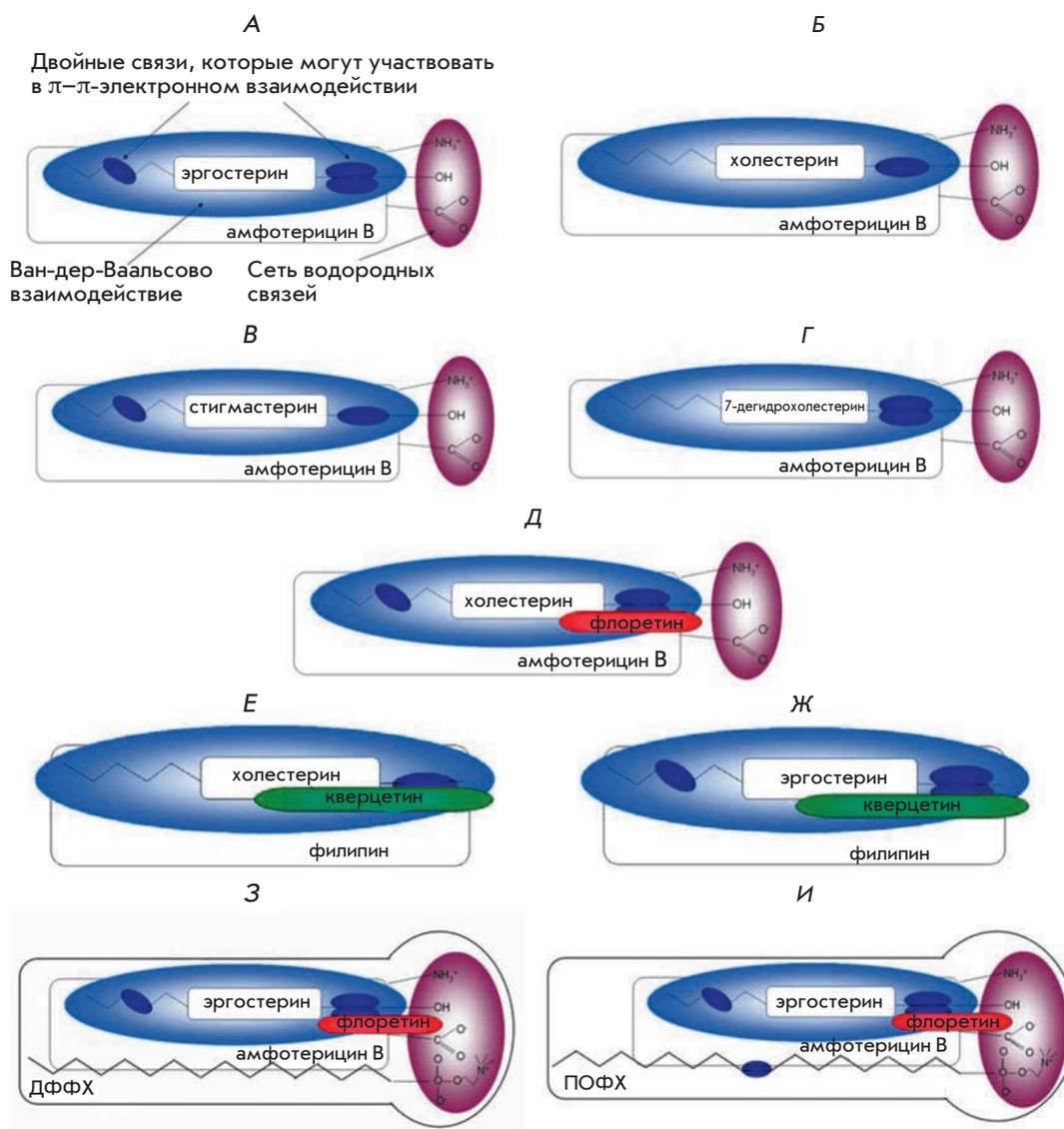


Рис. 2. Схематическое представление межмолекулярных связей, образующихся в комплексах АМВ-Эрг (А), АМВ-Хол (Б), АМВ-Стигм (В), АМВ-ДХол (Г), АМВ-Хол с флоретином (Д), ФЛ-Хол с кверцетином (Е), ФЛ-Эрг с кверцетином (Ж), АМВ-Эрг-ДФФХ с флоретином (З) и АМВ-Эрг-ПОФХ с флоретином (И). Комплексы АМВ-Хол и АМВ-Эрг по [20] с изменениями

что молекула АМВ может специфически взаимодействовать с молекулами фосфолипидов. Дуфорк и соавт. [34], основываясь на результатах 2Н-ЯМР-исследования липосом из димиристоилфосфатидилхолина с АМВ, отметили упорядочивание ацильных цепей молекул этого липида при взаимодействии с АМВ. Кроме того, на основе анализа спектров кругового дихроизма АМВ в липосомах в отсутствие стерина Балакришнан и Ешаран [35] предположили существование в бислое организованной многомолекулярной структуры, в которой АМВ взаимодействует с ацильными цепями молекул дипальмитоилфосфатидилхолина в соотношении 1 : 1. Результаты исследований, проведенных Фурниер и соавт. [36] методом дифференциальной сканирующей калориметрии, показали, что АМВ индуцирует разделение фаз в мембране, а именно в присутствии АМВ

в липосомах из дипальмитоилфосфатидилхолина выявляются одновременно три фазы. Первая фаза соответствует чистому фосфолипиду, вторая и третья характеризуются фазовым переходом в широком диапазоне температур выше температуры фазового перехода чистого фосфолипида. Более того, Паке и соавт. [23] показали дозозависимое увеличение температуры фазового перехода липидов из геле- в жидкокристаллическое состояние в присутствии АМВ. Мийо и соавт. [37] предположили, что молекулы АМВ взаимодействуют с полимолекулярными фосфолипидными ансамблями. Результаты Штернала и соавт. [38], полученные с использованием методов молекулярной динамики, не противоречат гипотезе о взаимодействии полярных голов АМВ и димиристоилфосфатидилхолина. Такое взаимодействие отмечено, в частности, между карбоксильной группой АМВ

и аминокгруппой липида. Херец и соавт. [39] предположили, что водородные связи между горизонтально ориентированными молекулами АМВ и полярными группами липидов приводят к конденсации бислоя.

Нам удалось найти только косвенные свидетельства возможного взаимодействия между полиеновыми макролидами и мембранными сфинголипидами. Например, Загер [40] показал, что полиеновые антибиотики влияют на концентрацию фосфолипидов и церамидов в плазматической мембране. Наджиек и соавт. [41] установили, что мутантный штамм *Saccharomyces cerevisiae*, способный расти без образования сфинголипидов, более восприимчив к АМВ, чем клетки дикого типа. Изучение влияния сфинголипидного состава мембраны на активность полиеновых макролидов представляет интерес еще и потому, что сфинголипиды, так же как стеринны и полиены, локализуются в липидных рафтах [17].

Целью представленной работы было установление молекулярных механизмов образования полиеновых трансмембранных пор в мембранах, содержащих различные фосфолипиды, стеринны и сфинголипиды. В качестве инструментов исследования использованы дипольные модификаторы – соединения, способные изменять величину дипольного потенциала мембран, а именно флавоноиды и стироловые красители. Основанием для применения дипольных модификаторов послужили данные об их успешном применении при исследовании процессов формирования и функционирования ионных каналов в модельных и клеточных мембранах [42–51].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали следующие реактивы: КСl, НЕРЕС, пентан, этанол, хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО), гексадекан и сквален, флоретин, флоридзин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, 2',4',6'-моногидрат тригидроксиацетофенона (ТГАФ), RH 421 и амфотерицин В (АМВ), нистатин (НС) и филиппин (ФЛ) (Sigma, США); RH 160 и RH 237 (Molecular Probes, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДФФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ДОФЭ), холестерин (Хол), эргостерин (Эрг), 7-дегидрохолестерин (ДХол), стигмастерин (Стигм), N-стеароил-фитосфингозин из *S. cerevisiae* (СФС), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), синтетический сфинголипид N-стеароил-

D-эритро-сфинганин (СЭС) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиззаминродамин) (ЛР-ДПФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). Химические структуры флавоноидов, стироловых красителей, полиенов, фосфолипидов, стериннов и сфинголипидов показаны на рис. 1.

Регистрация токов, протекающих через плоские липидные бислои

Формирование бислойных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [52] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода–воздух из раствора 1 мг/мл липида в пентане. Для образования монослоев использовали смеси фосфолипид : стерин или фосфолипид : эргостерин : сфинголипид в молярных соотношениях 67 : 33 моль % или 53 : 27 : 20 моль % соответственно. Каналообразующую активность полиенов измеряли при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (2.0 М КСl), кислотность растворов (рН 7.0) поддерживали буферной смесью 5 мМ Нерес-КОН.

Полиеновые антибиотики добавляли к водной фазе обоих отделений камеры: АМВ и НС из раствора в ДМСО 10^{-4} и 10^{-3} М соответственно и ФЛ из раствора в этаноле 10^{-4} М до конечной концентрации в околосмембранных растворах 10^{-8} – 10^{-6} М. Двустороннее введение полиеновых антибиотиков обусловлено тем, что согласно [8, 13, 15], каналы формируются из двух ассоциированных полупор. Конечная концентрация спирта или ДМСО в камере не превышала 0.1% и не вызывала изменения стабильности проводимости мембраны.

Флавоноиды флоретин, флоридзин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А и ТГАФ вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле или ДМСО, до конечной концентрации в околосмембранных растворах 20 мкМ, а стироловые красители RH 160, RH 237 и RH 421 – до концентрации 5 мкМ.

Ток, протекающий через бислойную липидную мембрану, измеряли в режиме фиксации потенциала. Для подачи трансмембранного потенциала (*V*) и отведения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М КСl. Положительным считали потен-

циал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для обработки данных использовали 8-поллярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц. Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Среднее отношение (I_{∞}/I_{∞}^0) равновесного интегрального трансмембранного тока, индуцированного каналобразующим агентом (АМВ, НС и ФЛ) в присутствии (I_{∞}) и в отсутствие дипольных модификаторов (I_{∞}^0), определяли как среднее арифметическое значение I_{∞}/I_{∞}^0 при измерении от трех до девяти бислюев (среднее \pm SE). Равновесное число функционирующих в мембране каналов определяли как отношение равновесного трансмембранного тока (I_{∞}^0) к току, протекающему через одиночный канал (i).

Проводимость одиночных каналов (g) определяли как отношение протекающего через одиночный канал тока (i) к трансмембранной разности потенциалов (V). Для построения гистограмм флуктуаций тока значения трансмембранных токов определяли по изменениям амплитуды тока при открывании (или закрывании) одиночных каналов. Общее число событий (N), используемых для анализа при фиксированном значении трансмембранного потенциала, составляло от 100 до 5000. По оси ординат откладывали относительные частоты значений трансмембранного тока n/N . Все пики на гистограммах аппроксимировали плотностью нормального распределения. В качестве критерия проверки гипотезы о законе распределения использовали критерий χ^2 ($P < 0.05$).

Измерение селективности каналов

При измерении катион-анионной селективности каналов на мембране создавали 10-кратный градиент концентрации электролита KCl. Измерение селективности АМВ-каналов проводили при концентрациях растворов 2.0 и 0.2 М KCl в *цис*- и *транс*-отсеках экспериментальной камеры соответственно. Число переноса для анионов (t^-) ($t^- + t^+ = 1$) рассчитывали согласно уравнению Гендерсона [53]:

$$V^{rev} = (RT/F)(1-2t^-)\ln(C_{\text{цис}}/C_{\text{транс}}), \quad (1)$$

где V^{rev} – потенциал реверсии, соответствующий нулевому трансмембранному току при заданном от-

ношении концентраций проникающих ионов с *цис*- и *транс*-стороны мембраны ($C_{\text{цис}}/C_{\text{транс}}$); R – универсальная газовая постоянная ($R = 8.31$ Дж/(моль·К)); T – термодинамическая температура ($T = 294$ К); F – число Фарадея ($F = 96485$ Кл/моль).

Конфокальная микроскопия гигантских одноламеллярных липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью Nanion vesicle prep pro (Германия) (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 25°C). Латеральное фазовое разделение визуализировали путем введения флуоресцентного зонда ЛР-ДПФЭ в исходный липидный раствор ПОФХ в хлороформе (11 мМ). Концентрация ЛР-ДПФЭ в образце составляла 1 моль %. Полученную суспензию липосом разделяли на аликвоты. В качестве контроля использовали аликвоту без АМВ. Экспериментальные образцы содержали 100 или 300 мкМ АМВ. Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0×/1.4 НСХ PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Аро (Leica Microsystems, Германия). Препараты наблюдали при температуре 25°C. Свечение ЛР-ДПФЭ возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислюе с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу [54], в то время как жидкая упорядоченная и твердая упорядоченная (гель) фазы остаются неокрашенными [55]. Для каждой системы проводили как минимум четыре независимых эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние дипольных модификаторов на проводимость одиночных амфотерициновых каналов

На *рис. 3* приведены примеры записей флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы в ДФФХ: Хол-мембранах (*рис. 3, левый столбец*) и ДФФХ: Эрг-бислюях (*рис. 3, правый столбец*), до и после введения дипольных модификаторов, флавоноидов (флоретина и кверцетина) и стироловых красителей (RH 160, RH 237 и RH 421). Из *рис. 3А,Б* видно, что ток, протекающий через одиночные АМВ-каналы в отсутствие дипольных модификаторов не зависит от вида стерина (Хол или Эрг) в мембране. Введение в мембраноомывающие растворы флоретина вызывает уменьшение трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы, как в ДФФХ: Хол-мембранах, так и в ДФФХ: Эрг-бислюях (*рис. 3В,Г*). При этом до-

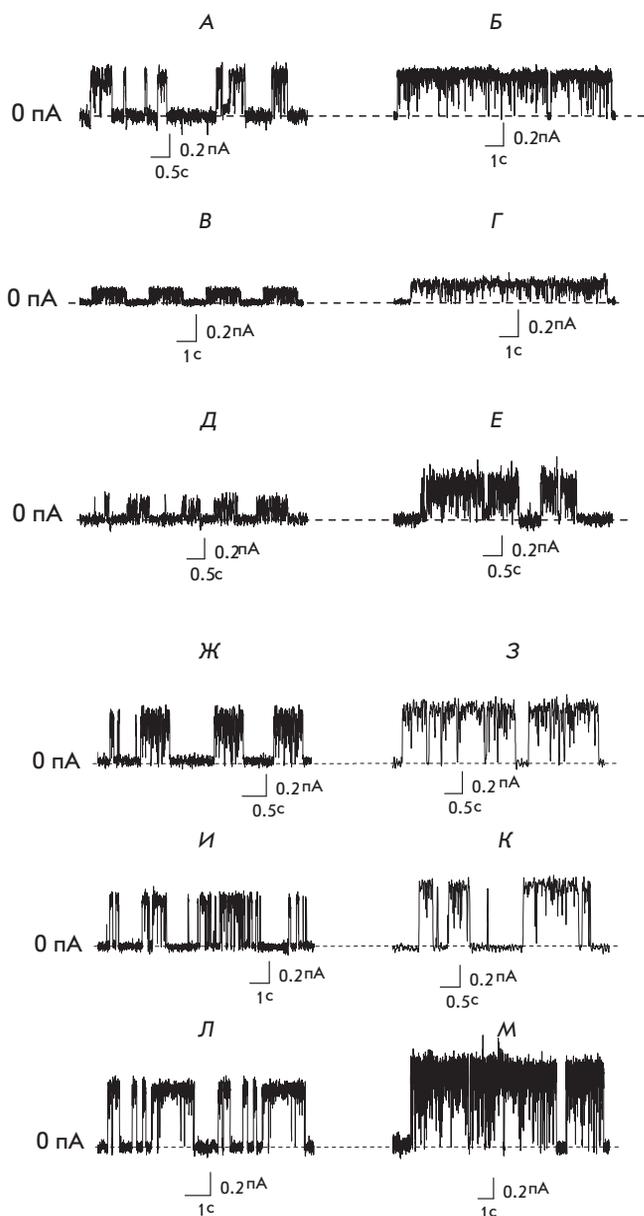


Рис. 3. Записи флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы в липидных бислоях. Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) и ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) в растворах 2.0 М КСl (рН 7.0). А, Б – контроль (отсутствие дипольных модификаторов). Мембраноомывающий раствор содержит (мкМ): 20 флоретина (В, Г), 20 кверцетина (Д, Е), 5 RH 160 (Ж, З), 5 RH 237 (И, К), 5 RH 421 (Л, М). Штриховые линии соответствуют 0 пА. V = 50 мВ

бавка кверцетина уменьшает трансмембранный ток, протекающий через АМВ-каналы в ДФФХ : Хол-мембранах, и не влияет на трансмембранный ток, протекающий через АМВ-каналы в ДФФХ : Эрг-мембранах (рис. 3Д,Е). Введение в мембраноомыва-

Таблица 1. Отношения проводимостей одиночных амфотерициновых каналов в отсутствие и в присутствии различных дипольмодифицирующих агентов при V = 50 мВ ($g/g_{V=50}$). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) и ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) в растворах 2.0 М КСl (рН 7.0)

Дипольный модификатор		Мембранообразующий раствор	
		ДФФХ : Хол	ДФФХ : Эрг
Флавоноид	Флоретин	3.30 ± 0.21	2.20 ± 0.41
	Флоридзин	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
	Кверцетин	1.72 ± 0.21	0.95 ± 0.15
	Генистеин	0.98 ± 0.09	–
	Генистин	0.96 ± 0.08	–
	Биоханин А	0.89 ± 0.11	–
	ТГАФ	0.91 ± 0.15	–
Стириловый краситель	RH 421	0.69 ± 0.07	0.49 ± 0.06
	RH 237	0.71 ± 0.08	0.61 ± 0.05
	RH 160	0.80 ± 0.09	0.63 ± 0.06

ющие растворы стириловых красителей серии RH вызывает увеличение трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы: ток возрастает в ряду RH 160 < RH 237 < RH 421 как в случае ДФФХ : Хол-мембран (рис. 3Ж,И,Л), так и в случае ДФФХ : Эрг-бислоев (рис. 3З,К,М).

В табл. 1 представлены отношения проводимостей одиночных АМВ-каналов в отсутствие и в присутствии дипольмодифицирующих агентов при трансмембранном потенциале, равном 50 мВ ($g/g_{V=50}$). Приведенные в табл. 1 результаты показывают, что флоретин уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембранах в 3 и 2 раза соответственно. При этом добавка кверцетина уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в 1.7 раза в ДФФХ : Хол-мембранах и практически не изменяет g в случае ДФФХ : Эрг-бислоев. Видно, что добавка в мембраноомывающие растворы других флавоноидов: флоридзина, биоханина А, ТГАФ, генистина или генистеина практически не влияет на проводимость АМВ-каналов. Введение в мембраноомывающие растворы стириловых красителей вызывает увеличение g в ряду RH 160, RH 237 и RH 421 в ДФФХ : Хол-мембранах в 1.3, 1.4 и 1.5 раза и в ДФФХ : Эрг-бислоях – в 1.6, 1.7 и 2.1 раза соответственно.

В табл. 2 представлены величины изменения дипольного потенциала ДФФХ : Хол- и ДФФХ :

Таблица 2. Изменение дипольного потенциала ($\Delta\phi_d(\infty)$, мВ) ДФФХ : Хол (67:33 моль %)* или ДФФХ : Эрг (67:33 моль %)* мембран в присутствии различных дипольмодифицирующих агентов

Дипольный модификатор		Мембранообразующий раствор	
		ДФФХ : Хол	ДФФХ : Эрг
Флавоноид, 20 мкМ	Флоретин	-75 ± 10	-150 ± 5
	Флоридзин	-45 ± 10	-50 ± 10
	Кверцетин	-110 ± 10	-105 ± 15
	Генистеин	-35 ± 5	-40 ± 10
	Генистин	-30 ± 5	–
	Биоханин А	-75 ± 15	-80 ± 15
	ТГАФ	-40 ± 10	-40 ± 10
Стириловый краситель, 5 мкМ	RH 421	50 ± 8	57 ± 9
	RH 237	75 ± 10	85 ± 5
	RH 160	55 ± 10	45 ± 5

*Результаты взяты из [69].

Эрг-бислоев в присутствии использованных дипольных модификаторов в мембраноомывающих растворах. Так, например, флоретин уменьшает дипольный потенциал ДФФХ : Хол-мембран на 75 ± 10 мВ, а ДФФХ : Эрг-бислоев на 150 ± 5 мВ. Добавка кверцетина в мембраноомывающие растворы приводит к практически одинаковому падению ϕ_d Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоев на 100 ± 15 мВ. Введение в мембраноомывающие растворы генистина и ТГАФ слабо влияет на ϕ_d ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-бислоев. Добавка в околосмембранные растворы стириловых красителей серии RH приводит к росту дипольного потенциала мембран, при этом способность увеличивать дипольный потенциал стеринсодержащих мембран возрастает в ряду RH 421 \approx RH 160 < RH 237. Добавка в околосмембранные растворы стирилового красителя RH 237 увеличивает ϕ_d стеринсодержащих бислоев на 80 ± 10 мВ независимо от стеринового состава мембраны. При этом RH 421 или RH 160 в мембраноомывающих растворах увеличивают дипольный потенциал ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембран на 55 ± 10 мВ и 50 ± 10 мВ соответственно. Сравнение величин, приведенных в табл. 1 и 2, указывает на корреляцию изменений проводимости одиночных АМВ-каналов и дипольного потенциала стеринсодержащих ДФФХ-бислоев при введении дипольных модификаторов. Полученные результаты позволяют

предположить, что изменение g при введении флоретина или стириловых красителей в растворы, омывающие Хол- и Эрг-содержащие ДФФХ-мембраны, и кверцетина в растворы, омывающие ДФФХ : Хол-бислой, может быть связано с изменением дипольного потенциала мембран. Выявленные несоответствия между изменениями проводимости одиночных АМВ-каналов и дипольного потенциала стеринсодержащих ДФФХ-бислоев при введении дипольных модификаторов позволяют утверждать, что изменение g обусловлено не только варьированием дипольного потенциала бислоя, но может быть результатом взаимодействия дипольных модификаторов (флоретина, кверцетина и/или стириловых красителей) с комплексами АМВ-Хол и/или АМВ-Эрг.

На рис. 2 схематически представлены межмолекулярные связи в полиен-стериновых комплексах. Известно, что полиен-стериновые комплексы образуются за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий [19]. Сила взаимодействия в этом случае зависит от параллельности и копланарности молекул полиена и стерина. Взаимная ориентация молекул происходит благодаря образованию водородных связей между ОН-группой молекулы стерина и аминокислотом молекулы полиена. Присутствие дополнительных (по сравнению с Хол) двойных связей в стероидном ядре и боковой цепи молекулы Эрг приводит к образованию более стабильного комплекса АМВ-Эрг за счет дополнительных точек π - π -электронного взаимодействия по сравнению с комплексом АМВ-Хол [20] (рис. 2А,Б). По этим причинам комплексы АМВ-Эрг и АМВ-Хол могут по-разному взаимодействовать с дипольными модификаторами.

Влияние дипольных модификаторов на индуцированную полиеновыми антимикотиками мультиканальную проводимость мембран

Варьирование стеринового состава. Для проверки предположения о взаимодействии дипольных модификаторов с полиен-стериновыми комплексами изучили влияние дипольмодифицирующих агентов на равновесный трансмембранный ток, индуцированный амфотерицином В. Среднее отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов (I_∞/I_∞^0), при трансмембранном напряжении 50 мВ представлено в виде диаграммы на рис. 4. Добавка флоретина в мембраноомывающие растворы вызывает существенное увеличение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ (I_∞) в ДФФХ : Хол-бислоях. В ДФФХ : Эрг-

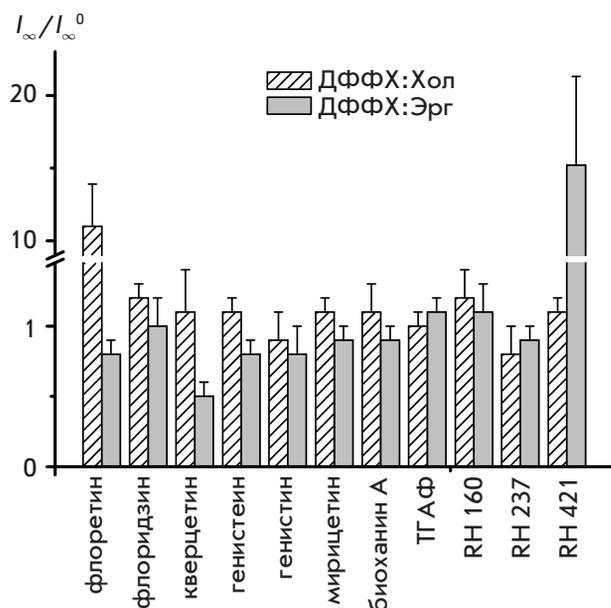


Рис. 4. Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного амфотерицином В в стерин-содержащих бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) или ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) и оmyваются 2.0 М КСl (рН 7.0)

мембранах влияние флоретина на I_{∞} отсутствует. Введение в мембраноомывающие растворы кверцетина не влияет на I_{∞} в ДФФХ : Хол-мембранах и приводит к уменьшению I_{∞} в ДФФХ : Эрг-бислоях. Влияния таких флавоноидов, как флоридзин, генистеин, генистин, биоханин А, мирицетин и ТГАФ, на I_{∞} в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-мембранах не наблюдается. Введение RH 421 в растворы, оmyвающие ДФФХ : Хол-бислои, практически не изменяет I_{∞} , а добавка этого модификатора в растворы, оmyвающие ДФФХ : Эрг-мембраны, увеличивает I_{∞} . При этом другие стироловые красители RH 160 и RH 237 не оказывают эффекта на мультиканальную активность АМВ в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-мембранах. По всей вероятности, в случае менее выгодного с энергетической точки зрения комплекса АМВ-Хол, флоретин, благодаря своей «шпильчатой» конформации, способен выполнять роль медиатора между полиеновой и стеринами молекулами и стабилизировать комплекс АМВ-Хол (рис. 2Д), что выражается в увеличении каналаобразующей активности АМВ в присутствии этого дипольного модификатора в Хол-содержащих мембранах. Кверцетин, благодаря большей, чем у флоретина, глубине погружения в бислои [56], может конкурировать со стеринами за взаимодействие с АМВ и де-

стабилизировать самый выгодный с энергетической точки зрения комплекс АМВ-Эрг, что выражается в уменьшении каналаобразующей активности полиена (рис. 4). Учитывая, что стироловый краситель RH 421 имеет промежуточную между RH 160 и RH 237 глубину погружения хромофора в бислои и наиболее близкую к нормали к поверхности мембраны ориентацию [57], можно предполагать его колокализацию с комплексом АМВ-Эрг. В этом случае стироловый краситель можно рассматривать в качестве третьего участника Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, служащего дополнительным взаимориентирующим фактором за счет участия в π - π -электронных взаимодействиях.

Учитывая, что главное отличие молекулы Эрг от Хол заключается в наличии двух двойных связей – в 7-м положении стероидного ядра и в 22-м положении боковой углеводородной цепи, были также выбраны стеринами, которые отличаются от холестерина наличием одной двойной связи в 7-м или 22-м положении, 7-дегидрохолестерин (ДХол) и стигмастерин (Стигм) соответственно (см. рис. 1). Установлено, что добавка флоретина в мембраноомывающий раствор приводит к большему росту равновесного трансмембранного тока, протекающего через ДФФХ : Стигм-мембраны ($I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 5.3 \pm 3.1$), по сравнению с ДФФХ : ДХол-бислоями ($I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 1.7 \pm 0.3$). Выраженность эффекта флоретина в модифицированных АМВ ДФФХ : Хол и ДФФХ : Стигм-мембранах, а также его отсутствие в ДФФХ : Эрг-бислоях и малость в случае ДФФХ : ДХол-мембран могут свидетельствовать в пользу сходства геометрии комплексов АМВ-Хол и АМВ-Стигм, АМВ-Эрг и АМВ-ДХол соответственно. Схематическое представление образования межмолекулярных связей в комплексах АМВ-ДХол и АМВ-Стигм представлено на рис. 2В,Г. Учитывая, что сходство молекул Хол и Стигм, а также Эрг и ДХол заключается в отсутствие или наличии двойной связи в положении 7, соответственно можно думать об определяющей роли распределения электрической плотности в области стероидного ядра (вблизи 7-го положения), что может сказываться на возможности образования водородной связи между гидроксильной группой молекулы стерина и одной из ОН-групп молекулы флоретина. Введение RH 421 в растворы, оmyвающие ДФФХ : ДХол- и ДФФХ : Стигм-бислои, практически не изменяет I_{∞} ($I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 1.1 \pm 0.1$). Поскольку RH 421 эффективен только в отношении ДФФХ : Эрг-мембран и не влияет на модифицированные АМВ ДФФХ : ДХол-бислои, а Эрг отличается от ДХол наличием двойной связи в 22-м положении, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что RH 421 является более чувствительным инстру-

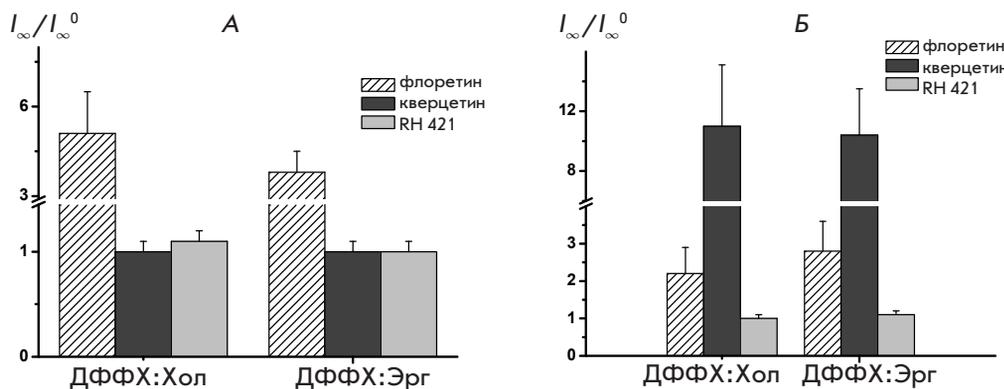


Рис. 5. Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного нистатином (А) и филипином (Б) в стеринсодержащих бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) или ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) и омываются 2.0 М КСl (рН 7.0)

ментом для изучения АМВ-стериновых комплексов, чем флоретин, а двойная связь в положении 22 все-таки влияет на геометрию и энергию комплекса.

Варьирование вида полиенового антибиотика.

Поскольку полиеновые молекулы также могут взаимодействовать с дипольными модификаторами, было изучено их влияние на равновесный трансмембранный ток, индуцированный в стеринсодержащих бислоях нистатином и филипином (рис. 1). Молекула НС отличается от молекулы АМВ отсутствием двойной связи в середине полиенового фрагмента, что может сказаться на π-π-электронных взаимодействиях в полиен-стериновых комплексах. Молекула ФЛ, в отличие от АМВ и НС, не содержит остатка аминокислоты. Подобное структурное отличие должно отразиться на формировании сети водородных связей между полиеновой и стеринной молекулами. В случае нистатина I_{∞} увеличивается при добавке флоретина как в ДФФХ : Хол-, так и в ДФФХ : Эрг-содержащих мембранах, при этом введение кверцетина не влияет на I_{∞} в присутствии в мембране как Хол, так и Эрг (рис. 5А). Оба флавоноида (флоретин и кверцетин) независимо от вида мембранообразующего стерина вызывают рост стационарного равновесного трансмембранного тока, индуцированного филипином (в 2 и 10 раз для ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембран соответственно) (рис. 5Б). При этом добавка RH 421 в растворы, омывающие ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембраны, не изменяет стационарный трансмембранный ток, индуцированный как нистатином, так и филипином (рис. 5А,Б). Нарушение конъюгации двойных связей в молекуле НС может дестабилизировать полиен-стериновый комплекс и увеличивать глубину погружения стерина в бислой, отодвигая его от полярной «головы» полиеновой молекулы. Флоретин, по всей вероятности, способен стабилизировать такие НС-стериновые комплексы. Отсутствие аминокислоты в молекуле филипина приводит к изменению сети водородных связей в по-

лиен-стериновых комплексах и их дестабилизации. Можно думать, что локализация кверцетина в углеводородной области бислоя делает возможным его взаимодействие с более гидрофобным полиеном филипином (рис. 2Е,Ж), в результате чего наблюдается существенный рост стационарного трансмембранного ФЛ-индуцированного тока в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоях.

Варьирование фосфолипидного состава.

Для изучения взаимодействия полиенов с другими мембранными компонентами была исследована каналообразующая активность АМВ в липидных бислоях, включающих, кроме стерина, различные фосфолипиды и сфинголипиды в присутствии флоретина и RH 421. Средние отношения равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ в Эрг-содержащих фосфолипидных бислоях, после и до введения дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0) при трансмембранном напряжении 50 мВ представлены в виде диаграммы на рис. 6А. Установлено, что введение флоретина в околосмембранный раствор приводит к существенному увеличению каналообразующей активности АМВ в Эрг-содержащих ПОФХ-бислоях (в 12 раз) и ДОФХ (в 4 раза), в то время как этот дипольный модификатор не влияет на модифицированные АМВ Эрг-содержащие мембраны, сформированные с участием ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС. Введение RH 421 в мембраноомывающий раствор вызывает многократное увеличение I_{∞} через Эрг-содержащие бислои из ДФФХ (в 15 раз) и ДФФС (в 42 раза) и не влияет на равновесный трансмембранный ток, индуцированный АМВ, в Эрг-содержащих мембранах, включающих ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ и ДОФС. Учитывая, что молекулы ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС имеют коническую, а ДОФХ и ПОФХ – цилиндрическую форму [58, 59], можно предположить, что последние лучше соответствуют жесткой молекуле АМВ. Схематическое представление образования межмолекулярных свя-

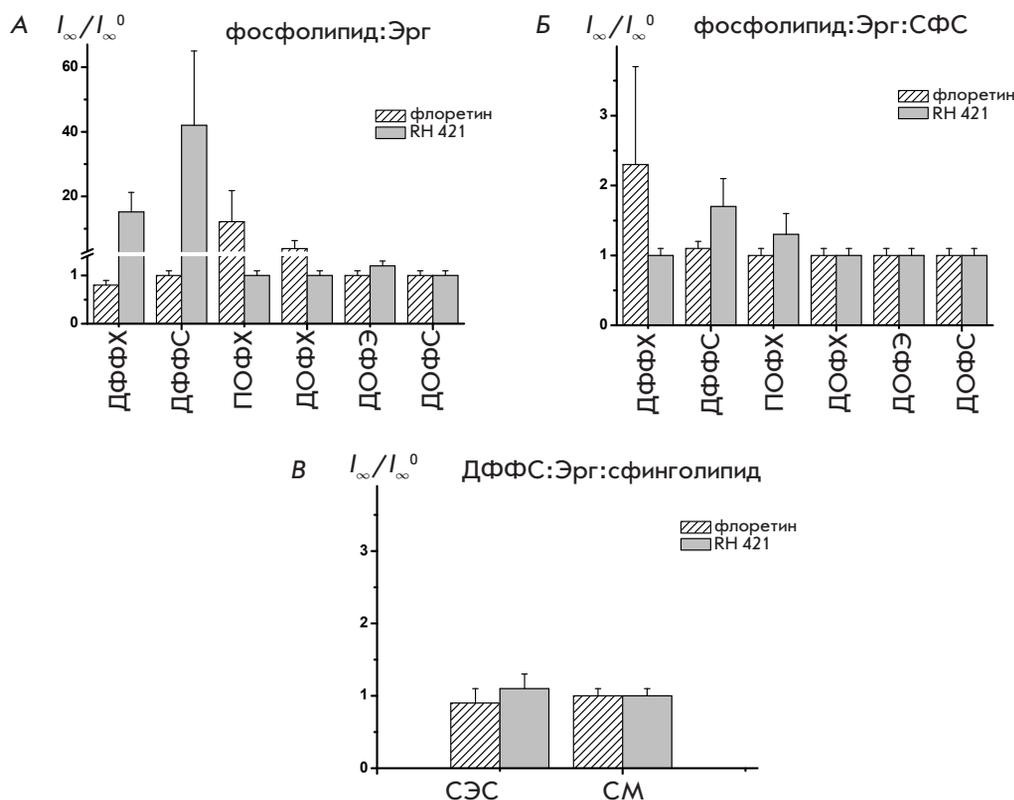


Рис. 6. Отношение равновесного транс-мембранного тока, индуцированного амфотерицином В в эргостеринсодержащих бислоях, после и до введения дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны сформированы из фосфолипид : Эрг (67 : 33 моль %) (А), фосфолипид : Эрг : СФС (53 : 27 : 20 моль %) (Б) и ДДФФС : Эрг : сфинголипид (53 : 27 : 20 моль %) (В) и омываются 2.0 М КСl (рН 7.0)

зей между АМВ-Эрг-ДФФХ и АМВ-Эрг-ПОФХ представлено на рис. 23,И. Можно думать, что сильное взаимодействие «полиен-фосфолипид» ослабляет взаимодействие «полиен-эргостерин». Такой полиен-стериновый комплекс может быть стабилизирован молекулами флоретина, которые, благодаря высокой конформационной подвижности и четырем функциональным гидроксильным группам, способны служить посредниками в образовании сети водородных связей между стеринном и АМВ. Несоответствие между жесткой палочкообразной молекулой АМВ и фосфолипидами конической формы (ДФФХ, ДДФС, ДОФЭ и ДОФС) предотвращает сильное взаимодействие «полиен-фосфолипид» и поэтому не происходит дестабилизации полиен-стеринового комплекса. Выше мы предположили, что RH 421 увеличивает каналобразующую активность АМВ в Эрг-содержащих ДДФХ-мембранах в результате вклада этого дипольного модификатора в сеть как водородных связей, так и π-π-электронных взаимодействий между молекулами Эрг и АМВ. По всей вероятности, аналогичные процессы имеют место и в случае модифицированных АМВ Эрг-содержащих ДДФС-бислоев.

Варьирование сфинголипидного состава. Введение в мембранообразующий раствор сфинголипидов существенно влияет на взаимодействие между молеку-

лами АМВ и фосфолипидов. Установлено, что флоретин в 2 раза увеличивает I_{∞} в случае ДДФХ : Эрг : СФС-мембран, а RH 421 – в 1.7 раза в ДДФС : Эрг : СФС-бислоях. При замене сфинголипидной (СФС на СЭС или СМ (рис. 6В)) или фосфолипидной (ДФФХ на ДДФС, ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ или ДОФС в случае флоретина и ДДФС на ДДФХ, ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ или ДОФС в случае RH 421 (рис. 6Б)) составляющей в указанных смесях не наблюдается увеличения I_{∞} в присутствии дипольных модификаторов. Полученные результаты показывают, что молекулы сфинголипидов, введенные в мембранообразующий раствор, играют существенную роль во взаимодействии молекул АМВ с фосфолипидами и стеринами.

Учитывая, что флоретин уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в ДДФХ : Эрг-мембранах, отсутствие влияния дипольного модификатора на равновесный трансмембранный ток, индуцированный АМВ, должно означать одномоментный скачок числа открытых АМВ-каналов. Необоснованность подобного заключения позволяет выдвинуть два предположения: 1) различие свойств одиночных АМВ-каналов, в частности, отсутствие селективности у АМВ-каналов, обеспечивающих интегральный ток, тогда проводимость каналов не должна быть функцией дипольного потенциала мембраны; 2) различие свойств липидного микроокружения каналов в мембране, т.е.

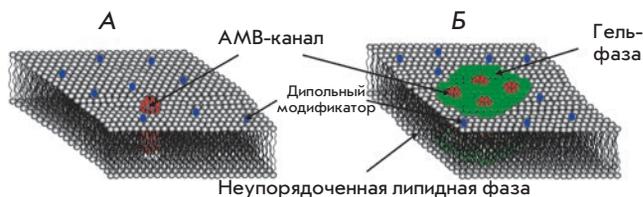


Рис. 7. Схематическое представление микроокружения АМВ-каналов в мембранах с различной концентрацией полиенового антимикотика, соответствующей функционированию одиночных каналов (А) и интегральному мультиканальному току (Б). При высоких концентрациях (Б) АМВ провоцирует образование в мембране более упорядоченной липидной фазы (показана зеленым цветом)

одиночные АМВ-поры и каналы, обеспечивающие интегральный ток, локализуются в областях мембраны с различными свойствами, в том числе и с различным значением дипольного потенциала бислоя (рис. 7).

Катион-анионная селективность амфотерициновых каналов

Для проверки первого предположения были проведены измерения катион-анионной селективности одиночных АМВ-каналов и интегрального трансмембранного тока. Результаты измерений показали, что АМВ-каналы в стеринсодержащих бислоях преимущественно анион-селективны, независимо от степени модификации мембраны АМВ. Число переноса анионов для одиночных АМВ-каналов составляет $t^- = 0.9 \pm 0.1$, а для интегрального тока, индуцированного АМВ, равно $t^- = 0.8 \pm 0.1$. Приведенные данные указывают на то, что ввиду высокой селективности проводимость АМВ-каналов, обеспечивающих интегральный ток, должна зависеть от дипольного потенциала мембраны.

Амфотерициновые каналы в мембранах с фазовым разделением

Существует ряд свидетельств в пользу второго предположения. Так, в присутствии АМВ показано

дозозависимое увеличение температуры фазового перехода липидов из гель- в жидкокристаллическое состояние [23]. Это означает, что АМВ провоцирует образование в мембране более упорядоченной фазы. Более того, как уже отмечалось ранее, молекулы АМВ обладают более высоким сродством к упорядоченным липидным доменам (рафтам) [17]. Поскольку упорядоченные липидные домены обогащены стеринами и сфинголипидами, очевидно, что их физико-химические свойства определяются липидным составом мембраны. Известно, что степень упорядоченности липидных молекул и вероятность формирования рафтов зависят от типа включенного в бислой стерина [60–62]. Существенное значение имеет и сфинголипидный состав мембраны. В частности, СФС отличается от СЭС наличием одной гидроксильной группы в положении С4. Идковиак-Балдис и соавт. показали, что С4-гидроксильное существование существенно влияет на физические и структурные свойства липидных микродоменов [63]. По всей вероятности, дополнительная гидроксильная группа способствует конденсации липидных молекул за счет увеличения числа водородных связей [64]. Плазматические мембраны клеток грибов содержат фитосфингозин и эргостерин [65], а плазматические мембраны клеток млекопитающих – сфингомиелин и холестерин [66]. Эволюционное предпочтение указанным комбинациям может быть обусловлено свойствами формируемых ими упорядоченных липидных доменов. Более того, некоторые фосфолипиды с низкой температурой плавления, которые не локализуются в упорядоченных мембранных областях, способны индуцировать образование этих доменов. Так, способность стабилизировать рафты зависит от структуры фосфолипидов и уменьшается в следующем ряду: ДФФХ, ДФФС, ПОФХ (ДОФХ) [67].

С помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских одноламеллярных липосом показано, что дипольные модификаторы влияют на фазовое разделение в липосомах [68]. Флавоноиды, биоханин А и флоретин приводят к разжижению твердокристаллических областей в мембранах липо-

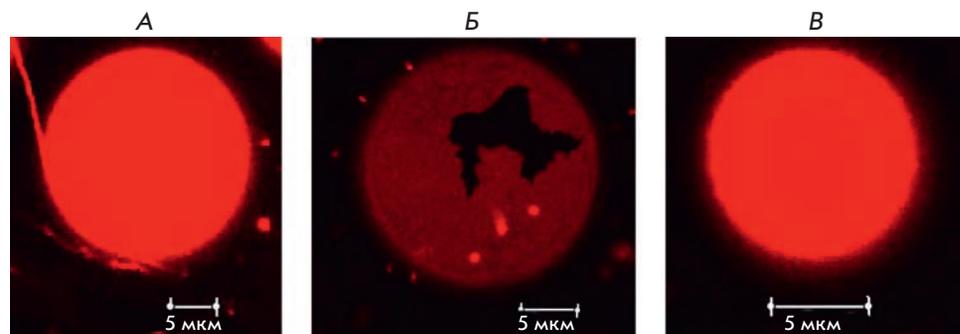


Рис. 8. Микрофотографии одноламеллярных липосом из ПОФХ в отсутствие полиенового антибиотика (А), в присутствии в мембраноомывающих растворах 300 мкМ АМВ (Б) и комбинации 300 мкМ АМВ и 400 мкМ флоретина (В)

сом и способствуют образованию рафтов в мембране, в то время как мирицетин скорее вызывает конденсацию бислоя. Данные, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, подтверждают влияние флавоноидов на фазовое разделение в липосомах [68].

Результаты наших исследований показали, что в отсутствие АМВ липосомы из ПОФХ окрашены гомогенно; латеральной гетерогенности мембран не наблюдается (рис. 8А). Введение 300 мкМ АМВ индуцирует образование в липосомах неокрашенных доменов дендритной формы, которые могут быть отнесены к твердокристаллической липидной фазе (рис. 8Б). Флоретин в концентрации 400 мкМ приводит к разжижению гель-доменов в модифицированных АМВ везикулах, и липосомы оказываются гомогенно окрашенными (рис. 8В). Эти данные указывают на то, что дипольные модификаторы влияют

на образование и динамику обогащенных полиеновыми макролидами упорядоченных мембранных областей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что каналобразующая активность полиеновых антибиотиков в липидных бислоях определяется суперпозицией нескольких факторов: дипольного потенциала мембраны, стабильности полиен-липидных комплексов и физико-химических свойств упорядоченных липидных областей. ●

Авторы выражают благодарность Е.Г. Чулкову за участие в некоторых экспериментах.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-33121), программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и НИИ-1721.2014.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Malewicz B., Momsen M., Jenkin H.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983. V. 23. P. 119–124.
- Kuwano M., Akiyama S., Endo H., Kohga M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 49. P. 1241–1248.
- Medoff G., Kwan C.N., Schlessinger D., Kobayashi G.S. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. P. 1146–1149.
- Craven P.C., Gremillion D.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. V. 27. P. 868–871.
- Shigemi A., Matsumoto K., Ikawa K., Yaji K., Shimodozono Y., Morikawa N., Takeda Y., Yamada K. // *Int. J. Antimicrob. Agent.* 2011. V. 38. P. 417–420.
- Guinet R., Chanas J., Goullier A., Bonnefoy G., Ambroise-Thomas P.J. // *Clin. Microbiol.* 1983. V. 18. P. 443–444.
- Hawkins J.L., Baddour L.M. // *Clin. Infect. Dis.* 2003. V. 36. P. 14–18.
- Andreoli T. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1974. V. 235. P. 448–468.
- González-Damián J., Ortega-Blake I. // *Membr. Biol.* 2010. V. 237. P. 41–49.
- Récamier K.S., Hernández-Gómez A., González-Damián J., Ortega-Blake I. // *J. Membr. Biol.* 2010. V. 237. P. 31–40.
- Samedova A.A., Kasumov Kh.M. // *Antibiot. Khimioter.* 2009. V. 54. P. 44–52.
- Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 2009. 512 с.
- de Kruijff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A., van Deenen L.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 339. P. 30–43.
- Baginski M., Resat H., Borowski E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1567. P. 63–78.
- Marty A., Finkelstein A. // *J. Gen. Physiol.* 1975. V. 65. P. 515–526.
- Venegas B., Gonzalez-Domian J., Celis H., Ortega-Blake I. // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 2323–2332.
- Czub J., Baginski M. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 16743–16753.
- Neumann A., Czub J., Baginski M. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 15875–15885.
- Neumann A., Baginski M., Czub J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 18266–18272.
- Baran M., Borowski E., Mazerski J. // *Biophys. Chem.* 2009. V. 141. P. 162–168.
- Matsumori N., Tahara K., Yamamoto H., Morooka A., Doi M., Oishi T., Murata M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 11855–11860.
- Hamilton K.S., Barber K.R., Davis J.H., Neil K., Grant C.W. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1062. P. 220–226.
- Paquet M.J., Fournier I., Barwicz J., Tancrede P., Auger M. // *Chem. Phys. Lipids.* 2002. V. 119. P. 1–11.
- Gabrielska J., Gagoś M., Gubernator J., Gruszecki W.I. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 2677–2685.
- Liberman E.A., Topaly V.P. // *Biofizika (Russian).* 1969. V. 4. P. 452–461.
- Hladky S.B., Haydon D.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. V. 318. P. 464–468.
- Brockmann H. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. V. 73. P. 57–79.
- Hsuchen C.C., Feingold D. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973. V. 4. P. 316–319.
- Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 2939–2944.
- Hartsel S.C., Perkins W.R., McGarvey G.J., Cacsó D.S. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 2656–2660.
- Cohen B.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1108. P. 49–58.
- Ruckwardt T., Scott A., Scott J., Mikulecky P., Hartsel S.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1372. P. 283–288.
- Fujii G., Chang J.E., Coley T., Steere B. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 4959–4968.
- Dufourc E.J., Smith I.C.P., Jarell H.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 778. P. 435–442.
- Balakrishnan A.R., Easwaran K.R.K. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 4139–4144.
- Fournier I., Barwicz J., Tancrede P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1373. P. 76–86.
- Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1558. P. 95–108.
- Sternal K., Czub J., Baginski M. // *J. Mol. Model (Online).* 2004. V. 10. P. 223–232.
- Herec M., Dziubinska H., Trebacz K., Morzycki J.W., Gruszecki W.I. // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 70. P. 668–675.
- Zager R.A. // *Am. J. Kidney Dis.* 2000. V. 36. P. 238–249.

41. Nagiec M.M., Young C.L., Zaworski P.G., Kobayashi S.D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 307. P. 369–374.
42. Sun X., Garlid K.D. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 19147–19154.
43. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 865–873.
44. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 13646–13658.
45. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Schagina L.V. // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 6889–6892.
46. Asandei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biophys. Chem.* 2008. V. 135. P. 32–40.
47. Остроумова О.С., Щагина Л.В. // *Биол. мембраны.* 2009. V. 26. P. 287–292.
48. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1790. P. 809–816.
49. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. // *Langmuir.* 2010. V. 26. P. 15092–15097.
50. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2011. V. 1808. P. 2051–2058.
51. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e25276.
52. Montal M., Muller P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 65. P. 3561–3566.
53. Morf W.E. // *Anal. Chem.* 1977. V. 49. P. 810–813.
54. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. // *Biochem. J.* 2010. V. 430. P. 415–423.
55. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. P. 489–497.
56. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 314. P. 65–71.
57. Passechnik V.I., Sokolov V.S. // *Bioelectrochemistry.* 2002. V. 55. P. 47–51.
58. Bezrukov S.M. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 5. P. 237–243.
59. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 472–479.
60. Hsueh Y.W., Chen M.T., Patty P.J., Code C., Cheng J., Frisken B.J., Zuckermann M., Thewalt J. // *Biophys. J.* 2007. V. 92. P. 1606–1615.
61. Cournia Z., Ullmann G.M., Smith J.C. // *J. Phys. Chem.* 2007. V. 111. P. 1786–1801.
62. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. P. 97–121.
63. Idkowiak-Baldys J., Grilley M.M., Takemoto J.Y. // *FEBS Lett.* 2004. V. 569. P. 272–276.
64. Lofgren H., Pascher I. // *Chem. Phys. Lipids.* 1977. V. 20. P. 273–284.
65. Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. P. 304–322.
66. Simons K., Toomre D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. V. 1. P. 31–39.
67. Bakht O., Pathak P., London E. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 4307–4318.
68. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. // *Chem. Phys. Lipids.* 2014. V. 178. P. 77–83.
69. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 9908–9914.

УДК 616.13-004.6-616.155.33-576.8.094.7

Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе

М. А. Челомбитко^{1,2*}, В. С. Шишкина^{1,2}, О. П. Ильинская¹, А. И. Каминный², Т. О. Павлунина², Н. Н. Самовилова², Е. В. Грачева², Э. М. Тарарак², Н. В. Проказова²

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

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

*E-mail: atma69@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.05.2014

РЕФЕРАТ Моноциты периферической крови больных атеросклерозом преактивированы и обладают некоторыми чертами тканевых макрофагов. Их адгезия к эндотелию в 1.5 раза выше, чем у моноцитов здоровых субъектов, и они экспрессируют ряд рецепторов и антигенов, характерных для тканевых макрофагов. В дополнение к этому ранее мы показали, что в моноцитах крови больных атеросклерозом, так же как и при *in vitro*-дифференцировке моноцитов в макрофаги, значительно активируется биосинтез ганглиозидов, главная функция которых – формирование мембранных рафтов. В настоящей работе мы исследовали экспрессию мембранных рафтов на различных субпопуляциях моноцитов в норме и при атеросклерозе. Моноциты больных атеросклерозом, как показано методом проточной цитометрии, отличались от моноцитов здоровых субъектов двукратным увеличением процентного содержания промежуточной субпопуляции (CD14⁺⁺/CD16⁺) и повышением экспрессии фракталкинового рецептора CX3CR1 на промежуточной и неклассической субпопуляциях (CD14⁺⁺/CD16⁺ и CD14⁺/CD16⁺⁺) (в 2.3 и 1.8 раза соответственно). Это свидетельствует о преактивированном состоянии моноцитов больных. В то же время экспрессия маркера мембранных рафтов была одинаковой на субпопуляциях моноцитов обеих исследованных групп. Однако изучение *in vitro* дифференцировки моноцитов в макрофаги показало, что уже на первые сутки культивирования экспрессия мембранных рафтов повышалась в 2 раза и к 7-му дню возрастала в 3 раза в сравнении со свежевыделенными моноцитами. Таким образом, можно предположить, что при атеросклерозе моноциты накапливают ганглиозиды, которые используются для формирования мембранных рафтов при макрофагальной дифференцировке моноцитов после их миграции в интиму артерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА атеросклероз, макрофаги, мембранные рафты, проточная цитометрия, субпопуляции моноцитов.

ВВЕДЕНИЕ

Моноциты – клетки иммунной системы, играющие ключевую роль в формировании врожденного и приобретенного иммунитета. Моноциты крови человека морфологически и функционально гетерогенны, и на основании дифференциальной экспрессии CD14 (компонент рецепторного комплекса, распознающего бактериальные липополисахариды) и CD16 (FcγRIII – низкоаффинный рецептор к Fc-фрагменту IgG) можно выделить несколько субпопуляций [1, 2]. Недавно Комитет по номенклатуре Международного союза иммунологов и ВОЗ приняли официальную номенклатуру, согласно которой предложено разде-

лять моноциты на три субпопуляции: классическую (CD14⁺⁺/CD16⁻), промежуточную (CD14⁺⁺/CD16⁺) и неклассическую (CD14⁺/CD16⁺⁺) (процентное содержание субпопуляций: 83-85, 4-5 и 7-11% соответственно) [3, 4].

В клинических и экспериментальных исследованиях показано существенное увеличение количества моноцитов промежуточной и неклассической субпопуляций при инфекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, что может свидетельствовать о провоспалительном характере их активности [5]. Кроме того, моноциты этих популяций являются главными продуцентами провоспа-

лительных цитокинов – фактора некроза опухолей (TNF) и интерлейкина-12 (IL-12) [6]. В патогенезе атеросклероза моноциты играют критическую роль, так как после привлечения в обогащенные липидами и липопротеинами области интимы артерий они под влиянием макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), продуцируемого активированным эндотелием, дифференцируются в макрофаги. Последние поглощают окисленные липопротеины и другие липиды и образуют насыщенные липидами пенистые клетки – главные клетки атеросклеротических бляшек [7]. Отмечено также, что при атеросклерозе значительно повышается относительное содержание моноцитов минорных субпопуляций [8, 9]. Установлено, что в периферической крови больных атеросклерозом моноциты преактивированы и обладают некоторыми чертами макрофагов. Их адгезия к эндотелию в 1.5 раза выше, чем моноцитов здоровых субъектов, и они экспрессируют ряд рецепторов (Fcγ-рецептор типа I и II, ICAM) и повышенный уровень МНС II, что характерно для тканевых макрофагов [10–12]. В дополнение к этому мы ранее показали, что в циркулирующих моноцитах больных атеросклерозом биосинтез и содержание ганглиозидов значительно выше, чем в моноцитах здоровых субъектов, так же как и при *in vitro*-дифференцировке моноцитов в макрофаги [13, 14].

Ганглиозиды – гликофинголипиды, содержащие сиаловые кислоты, играют активную роль в образовании, стабилизации, динамике и биологических функциях мембранных рафтов. Благодаря присутствию в их молекуле амидной связи и массивного углеводного фрагмента они с помощью большого количества водородных связей образуют в клеточных мембранах конгломераты с холестерином, сфингомиелином и рецепторными белками, так называемые мембранные микродомены (рафты), которые могут легко перемещаться в плоскости фосфолипидного слоя мембраны [15]. Таким образом, ганглиозиды в составе рафтов участвуют в процессах рецепции, адгезии, клеточной подвижности, апоптоза. Их качественный и количественный состав резко изменяется при дифференцировке и трансформации клеток.

Известно, что при активации лимфоцитов многие рецепторы транспортируются в рафты, где приобретают активную конформацию и образуют комплексы с корецепторами и другими вспомогательными белками. Рецепторные фосфатидилинозит-заякоренные белки, как и миристоилированные и пальмитоилированные белки, являются постоянными составляющими этих мембранных структур, обогащенных сфинголипидами и холестерином. Кроме того, в рафты индуктивно привлекаются трансмембранные белки,

формируя таким образом фокусы рецепции и адгезии [16].

В настоящей работе с целью выяснения механизма преактивации моноцитов при атеросклерозе с помощью метода проточной цитометрии мы провели сравнительное изучение экспрессии мембранных рафтов на различных субпопуляциях моноцитов из крови больных атеросклерозом и у здоровых субъектов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

В настоящей работе использовали образцы периферической крови, полученные в клинике ФГБУ «РКНПК» Минздрава России от больных с ангиографически подтвержденным атеросклерозом коронарных артерий ($n = 25$) и клинически здоровых доноров ($n = 15$). Во всех случаях получено информированное согласие больных. Средний возраст здоровых субъектов составил 25 ± 3 года, средний возраст больных – 55 ± 8 лет. Поскольку атеросклероз характерен практически для всех лиц пожилого возраста, то в контрольную группу (здоровых субъектов) вошли заведомо более молодые люди.

Выделение и цитофлуориметрический анализ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека

Мононуклеарные лейкоциты из периферической крови выделяли традиционным методом в градиенте плотности Ficoll-Paque™ PLUS (1.077 г/л) (Amersham Biosciences, США). Для этого венозную кровь, собранную в пробирки с 6% раствором EDTA (0.5 мл раствора EDTA на 10 мл крови), центрифугировали при 400 *g* в течение 30 мин. К осадку на дне пробирки, содержащему форменные элементы крови, добавляли фосфатно-солевой буфер (ФСБ) до исходного объема и тщательно ресуспендировали. Полученную суспензию аккуратно наслаивали на Ficoll-Paque™ PLUS в соотношении 2.5 : 1 и центрифугировали при 400 *g* в течение 30 мин. Интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки крови, собирали и дважды отмывали в ФСБ.

Экспрессию поверхностных маркеров мононуклеарных лейкоцитов анализировали с помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания. Мембранные рафты выявляли с помощью В-субъединицы холерного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor® 488 (Vybrant® Lipid Raft Labeling Kit, Molecular Probes, Inc.). Поверхностные рецепторы выявляли специфическими флуоресцентно мечеными мышиными моноклональными антителами: CD14-PC5 (Beckman Coulter Inc.), CD16-PE (Beckman Coulter Inc.), CD16-FITC (Beckman Coulter

Inc.), CCR5-PE (eBioscience Inc.), CX3CR1-PE (R&D Systems) и TLR-4-PE (eBioscience). К полученному после отмывки осадку добавляли ФСБ (pH 7.2), содержащий 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), из расчета 100 мкл раствора на пробу. Клетки ресуспендировали и переносили по 100 мкл суспензии в микропробирки объемом 2 мл. Пробы, содержащие В-субъединицу холерного токсина (СТВ), конъюгированную с Alexa Fluor 488, инкубировали в течение 10 мин; остальные пробы инкубировали в течение 30 мин в темноте при +4°C. Далее в каждую пробу добавляли по 300 мкл 1% формалина, суспензию анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В качестве изотипического контроля применяли мышиные иммуноглобулины IgG-изотипа, меченные красителями, аналогичными метке используемых моноклональных антител.

Цитофлуориметрические исследования проводили на проточном лазерном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием единых настроек прибора для всех образцов. Для анализа и визуализации данных цитофлуориметрии применяли программное обеспечение Summit V3.1 Built 844 (Cytomation Inc., США). Область моноцитов выделяли по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Общую популяцию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с SSC. Моноциты были разделены по уровню экспрессии рецепторов CD14 и CD16 на три субпопуляции: CD14⁺⁺/CD16⁻, CD14⁺⁺/CD16⁺ и CD14⁺/CD16⁺⁺. Отдельно для каждой субпопуляции оценивали уровень экспрессии рецепторов CCR2, TLR4 и CX3CR1 по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Культивирование и иммуноцитохимический анализ мононуклеарных клеток здоровых субъектов

Часть выделенных мононуклеарных клеток здоровых субъектов высевали на дно или стекла в чашки Петри (ø 60 мм) в концентрации 2–2.5 млн/мл в ростовой среде X-VIVO-10 (Lonza Biosciences, США), содержащей 2 mM L-глутамин, 0.01% фунгизона, 1% смеси пенициллин/стрептомицин (реактивы производства Sigma) и 10 нг/мл M-CSF (Biosource) [13].

Динамику изменений коэкспрессии мембранных рафтов и различных маркеров моноцитов (CD14, CD16) и маркера дифференцировки моноцитов в макрофаги (CD206) анализировали на разных сроках культивирования (1-, 4- и 7-е сутки) с помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием специфических флуоресцентно меченных мышиных моноклональных антител: CD14-PC5, CD16-PE, CD206-PE (все Beckman Coulter, США). Рафты выявляли с помощью В-субъединицы холер-

ного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor 488. Для этого клетки открепляли от пластиковой подложки резиновым скрабером и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Далее клетки окрашивали по описанной выше методике и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson).

Динамику изменений коэкспрессии мембранных рафтов с различными маркерами моноцитов и макрофагов на разных сроках культивирования (4-, 7- и 12-е сутки культивирования) анализировали с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Для этого клетки, высаженные на стекла, окрашивали с помощью В-субъединицы холерного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor 488, и антител, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (для выявления CD14-, CD16-, CD206-положительных клеток), и инкубировали в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. После этого клетки трижды отмывали в теплой среде и фиксировали 10% формалином в течение 10 мин. Затем препараты заключали в глицерин-желатин и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 5000B (фильтры BP 450-490, LP 515 и BP 515-560, LP 590), оснащенного цифровой фотокамерой DC 420 и системой для анализа изображения. В качестве изотипического контроля использовали IgG, конъюгированные с R-PE, того же подкласса, что и специфические антитела.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Excel, Statistica 7.0. Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали двусторонний U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его стандартного отклонения ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитофлуориметрический анализ субпопуляций моноцитов больных и здоровых субъектов

Моноциты и их субпопуляции идентифицировали методом проточной цитофлуориметрии по параметрам прямого и бокового светорассеяния и по уровню экспрессии поверхностных маркеров CD14 и CD16. Стратегия гейтирования, использованная для идентификации субпопуляций классических (CD14⁺⁺/CD16⁻), промежуточных (CD14⁺⁺/CD16⁺) и неклассических (CD14⁺/CD16⁺⁺) субпопуляций моноцитов, представлена на рис. 1А-В. Полученные цитофлуорограммы и процентное соотношение

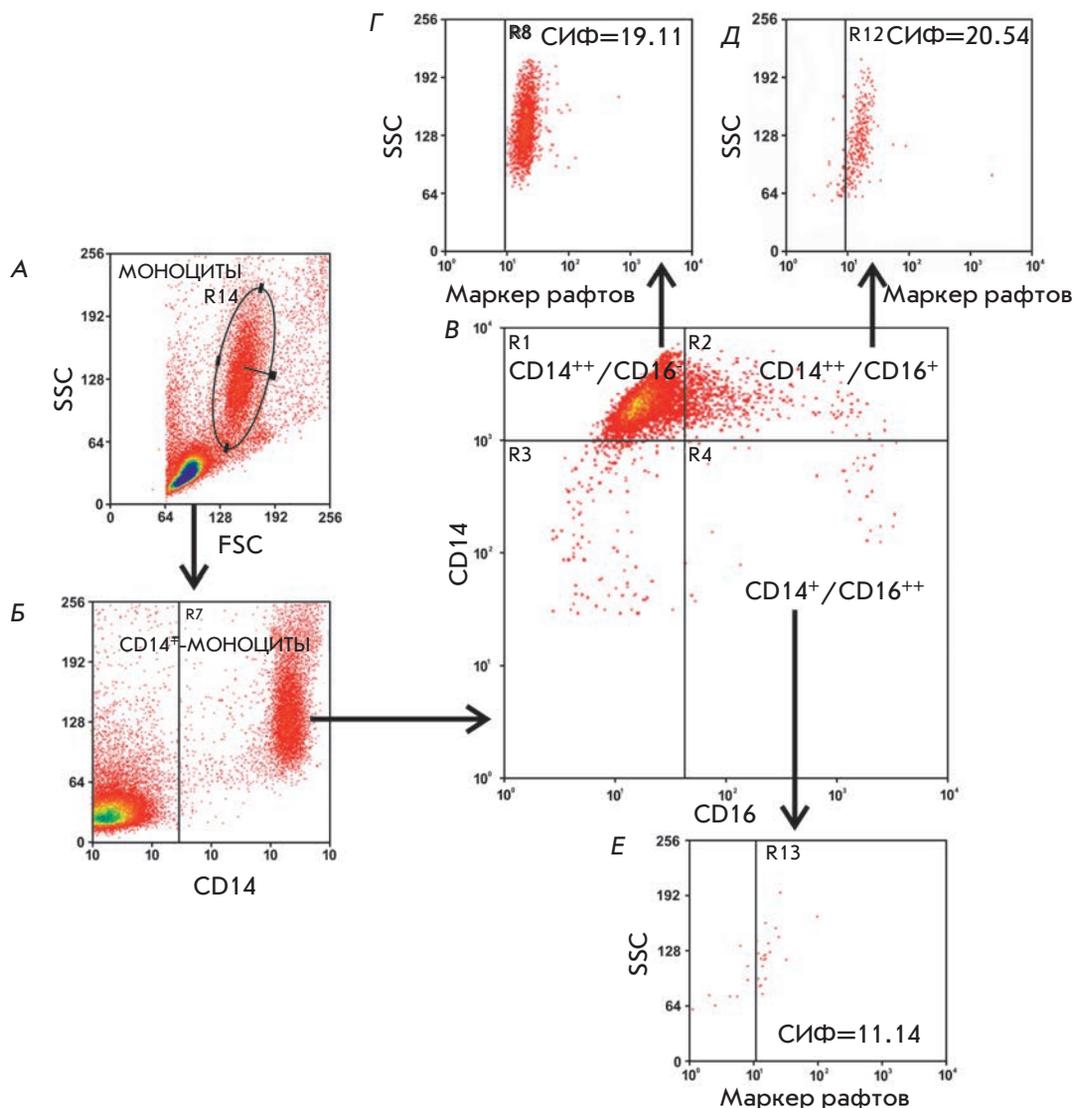


Рис. 1. Многоэтапное гейтирование при анализе субпопуляций моноцитов. А – выделение области моноцитов по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; Б – гейтирование общей популяции по CD14-позитивным событиям; В – идентификация субпопуляций моноцитов по уровню экспрессии поверхностных маркеров CD14 и CD16; Г–Е – гейтирование при анализе экспрессии различных рецепторов и мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов по параметрам SSC и позитивным событиям (на примере маркера рафтов GM1)

субпопуляций соответствуют опубликованным данным [3, 4].

На рис. 1Г-Е приведены результаты цитофлуориметрического анализа мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов с помощью моноклональных антител к CD14 и CD16 и В-субъединицы холерного токсина, выявляющей мембранные рафты. Для обнаружения рафтов на мембранах целых клеток мы применили широко используемый метод, основанный на очень высоком сродстве (10^{-12} M) В-субъединицы холерного токсина к ганглиозиду GM1. Метод заключается в их взаимодействии на клеточной мембране, хотя содержание этого ганглиозида по сравнению с другими ганглиозидами в плазматической мембране клеток крови мало [17]. Таким образом, использование GM1 в качестве маркера рафтов связано не столько с его важностью для структуры рафтов,

сколько с доступностью как реагента [18]. Анализ результатов, проведенный с помощью программного обеспечения Summit V3.1 Built 844, показал, что все субпопуляции моноцитов экспрессировали GM1 – маркер мембранных рафтов (рис. 1Г-Е).

Отметим, что наши данные отчасти противоречат результатам, полученным ранее Moreno-Altamirano и соавт. [19], которые на основании экспрессии рафтов разделили моноциты здоровых лиц на две популяции – CD14⁺/GM1⁺ (95.5% с низкой экспрессией рафтов) и CD14⁺/GM1⁺⁺ (2.5% с высокой экспрессией рафтов). При анализе рафтов они, как и мы, использовали флуоресцентно меченную В-субъединицу холерного токсина. Мы наблюдали иную картину (рис. 1Г-Е): классическая и промежуточная субпопуляции моноцитов обладали одинаковой экспрессией рафтов, низкая экспрессия была характерна только

для неклассической субпопуляции. Такое противоречие может определяться использованием Moreno-Altamirano и соавт. иной стратегии гейтирования. Действительно, как показывают данные *рис. 2А,Б*, по характеристикам гранулярности (SSC) и размера (FSC), которые отличались от показателей моноцитов внутри гейта, нами были выявлены так называемые внегейтовые классическая (CD14⁺⁺/CD16⁻) и промежуточная (CD14⁺⁺/CD16⁺) субпопуляции моноцитов. При этом последняя субпопуляция обладала более высокой экспрессией маркера рафтов, чем классическая. Наиболее вероятно, что, в отличие от нас, Moreno-Altamirano и соавт. [19], скорее всего, учитывали клетки внегейтовых популяций. Моноциты внегейтовых популяций в равных количествах наблюдались нами как у больных, так и у здоровых субъектов (*рис. 2Б*). Свойства и функции этой популяции нуждаются в дальнейшем изучении.

На *рис. 3А,Б* представлены типичные цитофлуорограммы субпопуляций моноцитов здорового человека и больного атеросклерозом. Данные *рис. 3В* показывают, что у больных атеросклерозом значительно повышено процентное содержание моноцитов промежуточной субпопуляции ($20.7 \pm 7.0\%$) и снижено содержание моноцитов классической субпопуляции ($68.6 \pm 7.9\%$) по сравнению со здоровыми субъектами (12.8 ± 3.4 и $74.8 \pm 7.6\%$ соответственно). Таким образом, при атеросклерозе, по-видимому, происходит перераспределение субпопуляций моноцитов – увеличивается доля моноцитов с промежуточным фенотипом (CD14⁺⁺/CD16⁺) за счет снижения доли главной субпопуляции классических моноцитов (CD14⁺⁺/CD16⁻). Содержание моноцитов неклассической субпопуляции у больных и здоровых было одинаковым.

Полученные данные согласуются с результатами ряда исследований, посвященных изучению субпопуляций моноцитов при атеросклерозе. Так, установлено, что высокий уровень моноцитов промежуточной субпопуляции (CD14⁺⁺/CD16⁺) связан с повышением индекса массы тела и увеличением толщины комплекса интима-медиа. Клинические данные свидетельствуют о более высоком содержании моноцитов CD14⁺⁺/CD16⁺ и суммарной популяции CD16⁺-моноцитов у пациентов с ишемической болезнью по сравнению со здоровыми субъектами. Увеличение количества моноцитов CD16⁺-субпопуляций было связано с преобладанием нестабильных бляшек в коронарных артериях и неблагоприятным прогнозом при ишемической болезни сердца [3, 6, 20]. Следует также подчеркнуть, что до недавнего времени во многих клинических исследованиях CD14⁺⁺/CD16⁻ и CD14⁺/CD16⁺⁺-субпопуляции моноцитов анализировали вместе, так как не был принят стандартный протокол гейтирования при анализе цитофлуори-

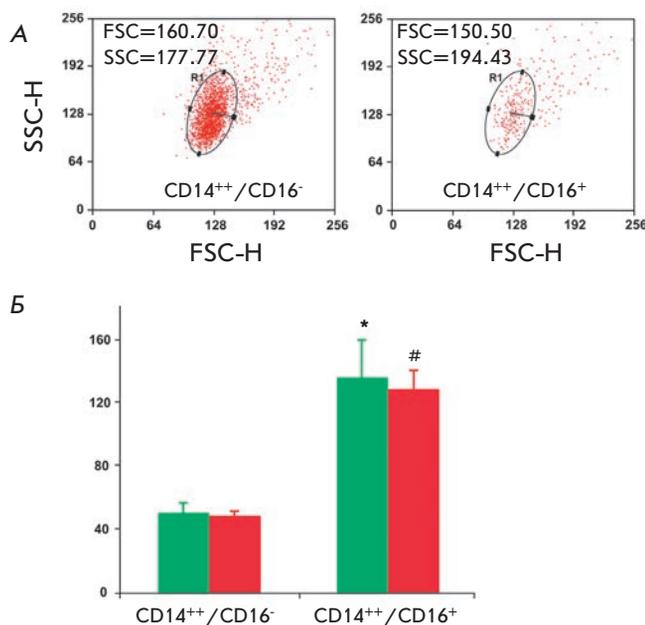


Рис. 2. Субпопуляции клеток крови здорового субъекта, располагающиеся вне гейта моноцитов. А – характеристика субпопуляций CD14⁺⁺/CD16⁻ и CD14⁺⁺/CD16⁺-клеток по гранулярности (SSC) и размерам (FSC); Б – сводные данные по интенсивности флуоресценции маркера рафтов (GM1) на CD14⁺⁺/CD16⁻ и CD14⁺⁺/CD16⁺-клетках у 15 здоровых субъектов (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде $M \pm SD$. * $\#P < 0.5$

метрических данных для выделения субпопуляций моноцитов. Это не позволяло сделать однозначный вывод о роли отдельных CD16⁺-субпопуляций в патогенезе атеросклероза. Как видно из данных *рис. 3В*, значимых различий в процентном содержании моноцитов неклассической субпопуляции у здоровых субъектов и у больных атеросклерозом не выявлено.

Экспрессия рецепторов цитокинов на субпопуляциях моноцитов

Хемокины и их рецепторы выполняют функцию специфичного привлечения различных субпопуляций моноцитов в область воспаления [21]. Известно, что популяции моноцитов различаются по экспрессии хемокиновых рецепторов [22]. Например, классическая субпопуляция CD14⁺⁺/CD16⁻ характеризуется высоким уровнем CCR2 – рецептора хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP-1), умеренной экспрессией CX3CR1 – рецептора фракталкина и низким уровнем CCR5 – рецептора воспалительных цитокинов CCL3, CCL4, CCL8, CCL3.

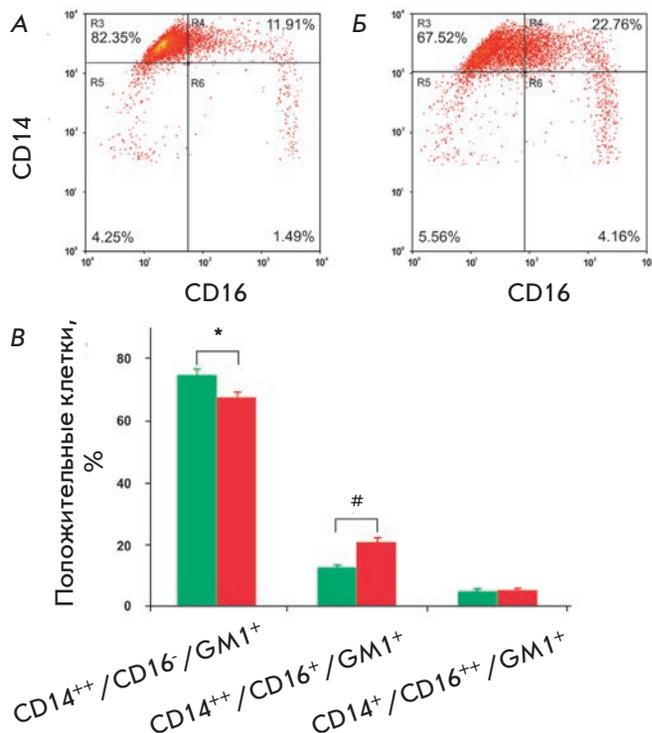


Рис. 3. Субпопуляции моноцитов здоровых субъектов и больных атеросклерозом. Типичные цитофлуорограммы субпопуляций моноцитов здорового субъекта (А) и больного атеросклерозом (Б); В – сводные данные по процентному соотношению субпопуляций моноцитов у 15 здоровых субъектов (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде $M \pm SD$. * $P < 0.05$

CD16⁺-субпопуляции негативны по CCR2, экспрессируют высокий уровень CX3CR1- и CCR5-рецепторов. Также установлено, что эти два рецептора играют заметную роль в формировании атеросклеротических поражений, так как их лиганды найдены в атеросклеротических бляшках и экспрессируются эндотелиальными клетками после их активации цитокинами [23, 24]. В связи с этим методом проточной цитофлуориметрии с тройным окрашиванием моноклональными антителами мы изучили экспрессию CCR5, CX3CR1 и общего для всех моноцитов рецептора LPS (TLR-4) на моноцитах здоровых субъектов и больных атеросклерозом. Не выявлено значимых различий в экспрессии CCR5 и TLR-4 между всеми субпопуляциями моноцитами больных атеросклерозом и здоровых субъектов (данные не приведены).

Экспрессия CX3CR1 (рецептора фракталкина) на промежуточной и неклассической субпопуляциях была выше, чем на классических моноцитах, что согласуется с представлениями о его локализации на CD16⁺-моноцитах [23]. При этом у больных обе

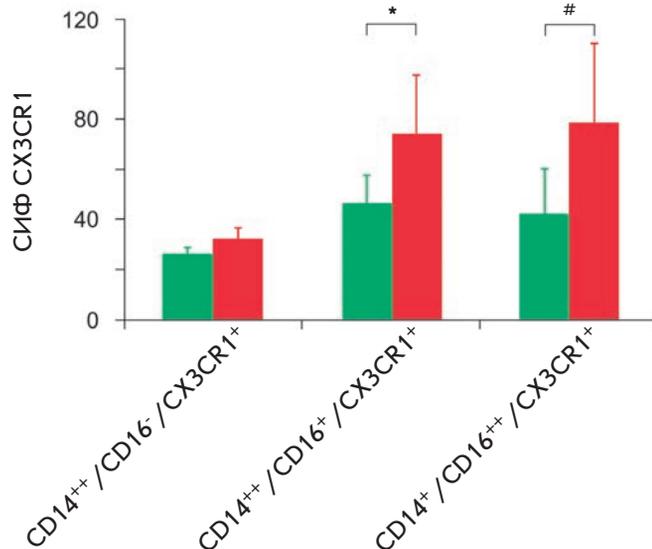


Рис. 4. Экспрессия рецептора фракталкина (CX3CR1) на различных субпопуляциях моноцитов у 15 здоровых субъектов и 25 больных атеросклерозом. Различия статистически значимы для CD16⁺-клеток здоровых субъектов (зеленые столбики) и больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде $M \pm SD$. $P < 0.05$

CD16⁺-субпопуляции моноцитов имели в 2 раза более высокую интенсивность флуоресценции CX3CR1, чем моноциты здоровых субъектов (рис. 4).

Показана однозначная роль CX3CR1/CX3CL1 в формировании атеросклеротических поражений сосудов человека и при экспериментальном атеросклерозе у мышей [24]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают результаты предыдущих исследований.

Экспрессия липидных рафтов на субпопуляциях моноцитов

Ранее мы установили, что в моноцитах крови больных атеросклерозом значительно активируется биосинтез ганглиозидов, главная функция которых – формирование липидных рафтов [15]. На этом основании мы предположили, что преактивация циркулирующих моноцитов при атеросклерозе сопровождается повышением количества липидных рафтов, необходимых для функционирования мембранных белков.

Ранее было показано, что многие антигены и рецепторы моноцитов, такие, как CD14, CD32, CD64, CD11/CD18, главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС II) являются постоянными составляющими мембранных рафтов [25, 26]. При активации моноцитов в плазматическую мембрану транс-

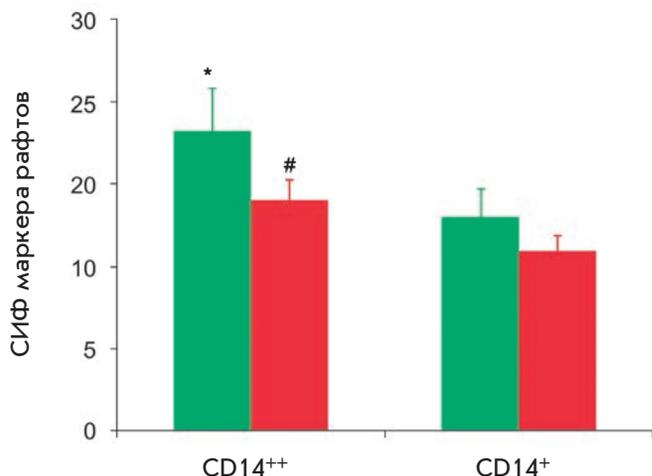


Рис. 5. Сводные данные по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) для маркера рафтов (GM1) на субпопуляциях моноцитов 15 здоровых доноров (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде $M \pm SD$. *# $P < 0.05$

портируются дополнительные белковые молекулы. Например, в определенных условиях CD16 мобилизуется из цитозольных депо в мембранные рафты [27]. Для активации и функционирования моноцитов необходима интеграция отдельных рафтов в большие платформы с привлечением дополнительных белковых компонентов [28, 29]. Разрушение рафтов обработкой клеток нистатином или метилциклодекстрином (реагентами, связывающими холестерин), наоборот, приводит к утрате ассоциации рецепторов в липидных платформах и, как следствие, к нарушению проведения сигналов и клеточных ответов на специфичные лиганды [10].

Как можно видеть из данных, приведенных на рис. 3B, процентное соотношение между субпопуляциями моноцитов, экспрессирующих GM1⁺-рафты (CD14⁺⁺/CD16⁻/GM1⁺, CD14⁺⁺/CD16⁺/GM1⁺ и CD14⁺/CD16⁺⁺/GM1⁺), у здоровых субъектов и у больных атеросклерозом не различалось, однако при атеросклерозе происходило перераспределение моноцитов между субпопуляциями CD14⁺⁺/CD16⁻, CD14⁺⁺/CD16⁺ и CD14⁺/CD16⁺⁺ (см. выше).

Анализ флуоресценции после тройного окрашивания антителами к CD14, CD16 и В-субъединицей холерного токсина показал, что СИФ рафтов на моноцитах с высокой экспрессией CD14 была выше, чем на моноцитах с низкой экспрессией CD14 как у больных, так и у здоровых субъектов (в 1.4 и 1.27 раза соответственно) (рис. 5). На основании полученных данных можно сделать вывод о неочевидности существования прямой связи между накоплением гангли-

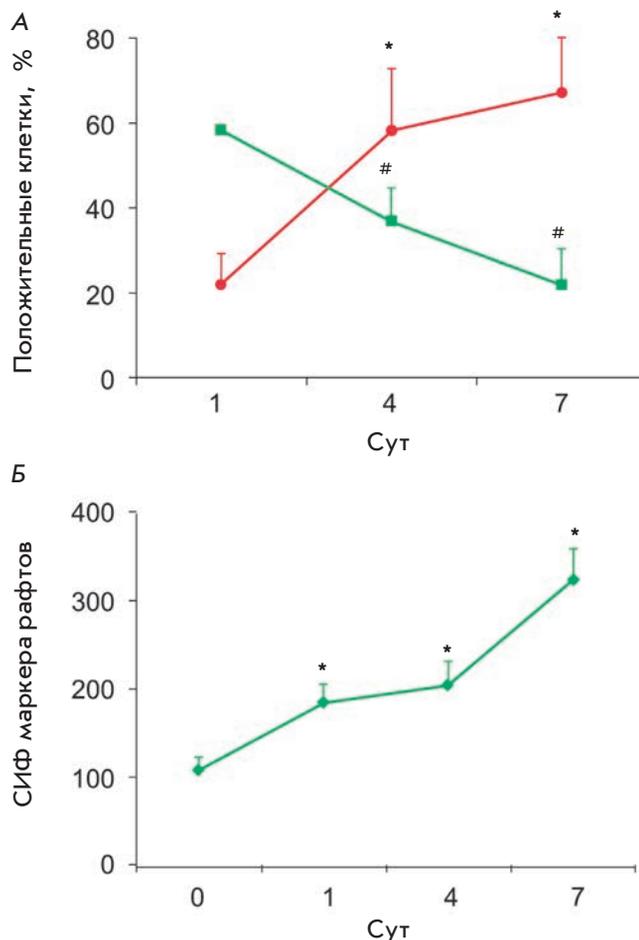


Рис. 6. Цитофлуориметрическое изучение процесса *in vitro*-дифференцировки моноцитов здоровых субъектов в культуре. А – изменение доли CD14⁺/CD16⁻ (■) и CD14⁺/CD206⁺-клеток (•) в процессе дифференцировки ($n = 3$). *#Различия статистически значимы между 1- и 4-ми, 1- и 7-ми сутками; Б – изменение экспрессии маркера рафтов на CD14⁺/CD206⁺-клетках в процессе дифференцировки ($n = 3$). *Различия статистически значимы между нулевой точкой и 1-, 4- и 7-ми сутками. Значения представлены в виде $M \pm SD$. *# $P < 0.05$

озидов в моноцитах при атеросклерозе и увеличением количества рафтов в мембранах этих клеток. Мы предположили, что этот пул ганглиозидов может реализоваться в виде липидных рафтов в результате дифференцировки преактивированных моноцитов в интиму артерий при атерогенезе.

Цитофлуориметрический анализ мембранных рафтов культивируемых моноцитов/макрофагов здоровых субъектов

Ранее мы наблюдали значительное повышение синтеза ганглиозидов при *in vitro*-дифференцировке

моноцитов человека в макрофаги [14]. Нами также было установлено, что уровень мРНК GM3-синтазы (ключевой фермент синтеза ганглиозидов) был значительно выше в культивируемых моноцитах/макрофагах, чем в свежевыделенных моноцитах, и в интима атеросклеротической бляшки в сравнении с интимой непораженных участков аорты человека [30]. Необходимо отметить, что в интима атеросклеротических артерий макрофаги являются главными клетками, в то время как в нормальной интима их практически нет.

В настоящей работе с помощью цитофлуориметрического анализа культивируемых моноцитов здоровых субъектов показано снижение доли CD14⁺/CD16⁺-клеток и увеличение доли CD14⁺/CD206⁺-клеток (рис. 6А), что свидетельствует о дифференцировке моноцитов в макрофаги [30]. Методом тройного окрашивания антителами к CD14, CD206 (маркер макрофагальной дифференцировки) и флуоресцентно меченной В-субъединицей холерного токсина выявлено двукратное увеличение СИФ рафтов уже через 24 ч и трехкратное – на 7-е сутки культивирования по сравнению со свежевыделенными моноцитами (рис. 6Б).

Данные настоящей работы в совокупности с полученными нами ранее результатами [13, 14, 30] указывают на вероятную связь активации биосинтеза и, как следствие, повышения уровня ганглиозидов и более высокой экспрессии липидных рафтов в культивируемых макрофагах в сравнении со свежевыделенными моноцитами. Все большее количество данных подтверждает, что при воспалительных патологиях, сопровождающихся повышенной продукцией цитокинов, таких, как TNF-α, M-CSF или IL-6, моноциты преактивированы уже в кровотоке до их миграции в очаги воспаления [10-12]. В связи с этим представляется вполне вероятным, что установленное нами ранее накопление ганглиозидов активированными моноцитами больных атеросклерозом [13] необходимо для образования мембранных рафтов после инфильтрации моноцитов в интиму сосудистой стенки с их последующей дифференцировкой в макрофаги.

В предыдущих работах методами иммуноцитохимии с использованием специфических антител к основному ганглиозиду моноцитов/макрофагов мы установили, что в интима атеросклеротических поражений человека присутствует большое количество клеток с высокой экспрессией этого ганглиозида. Изучение фенотипа этих клеток показало, что большинство из них – макрофаги [31, 32].

Изучение экспрессии маркеров дифференцировки и липидных рафтов двойным окрашиванием моноцитов/макрофагов показало, что значительная

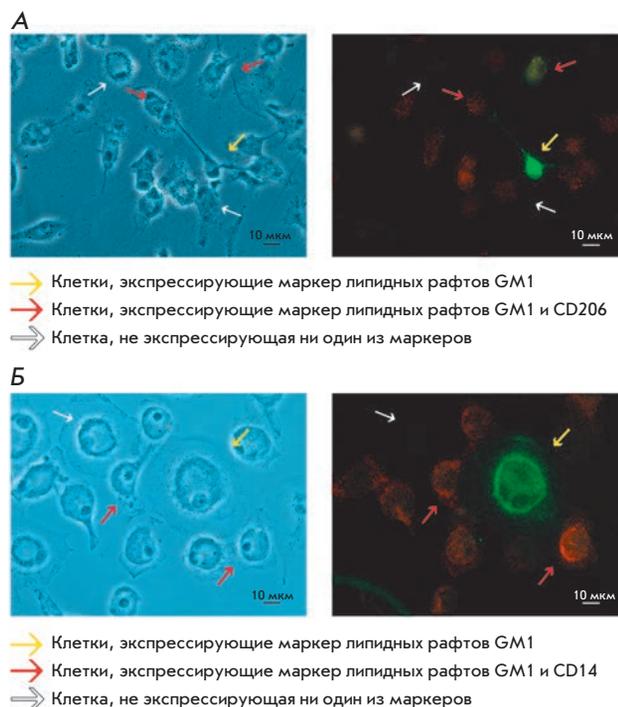


Рис. 7. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание культивируемых моноцитов/макрофагов здорового субъекта. Двойное окрашивание с помощью В-субъединицы холерного токсина, выявляющей ганглиозид GM1, и моноклональных антител, распознающих маркер дифференцировки CD206 (А) или маркер моноцитов/макрофагов CD14 (Б). Левое изображение получено фазово-контрастной микроскопией тех же клеток. Масштабный отрезок 10 мкм

часть CD14⁺/CD206⁺-клеток окрашивается на рафты (рис. 7А,Б). На всех сроках культивирования присутствовало небольшое количество клеток различной морфологии с высокой экспрессией маркера рафтов. Среди этих клеток встречались клетки как экспрессирующие, так и неэкспрессирующие маркеры макрофагов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитофлуориметрическое изучение с использованием единой стратегии гейтирования субпопуляций моноцитов показало, что в периферической крови как больных атеросклерозом, так и здоровых субъектов можно выявить три субпопуляции моноцитов (классическую, промежуточную и неклассическую). У больных атеросклерозом наблюдалось увеличение доли промежуточной (CD14⁺⁺/CD16⁺) и снижение доли классической (CD14⁺⁺/CD16⁻) субпопуляций моноцитов в сравнении со здоровыми субъектами. Моноциты промежуточной субпопуляции у них ха-

рактиковались более высокой экспрессией рецептора фракталкина CX3CR1, чем у здоровых субъектов. Моноциты больных и здоровых субъектов не различались по экспрессии мембранных рафтов. Однако CD14⁺⁺-моноциты отличались от CD14⁺-моноцитов более высокой экспрессией рафтов. Кроме того, в обеих исследованных группах выявлены так называемые внегетовые классическая (CD14⁺⁺/CD16⁻) и промежуточная (CD14⁺⁺/CD16⁺) субпопуляции моноцитов, при этом последняя субпопуляция обладала более высокой экспрессией маркера рафтов. В процессе культивирования моноцитов/макрофагов в присутствии M-CSF происходила их активация с дальнейшей дифференцировкой, сопровождающейся трехкратным увеличением экспрессии мембранных рафтов. В совокупности с нашими предыдущими данными можно заключить, что накопление ганглиозидов – незаменимых компонентов

рафтов – в преактивированных моноцитах больных атеросклерозом не приводило к повышению экспрессии мембранных рафтов. Однако полученные в настоящей работе данные позволяют предположить, что при дифференцировке моноцитов в макрофаги накопленный пул ганглиозидов реализуется в макрофагах в виде рафтов, необходимых для активации адгезии и фагоцитоза. ●

Авторы благодарят проф. Ю.А. Романова (Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ) за помощь в проведении цитофлуориметрического анализа.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 10-04-00888а и 12-04-31639).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zawada A.M., Rogacev K.S., Rotter B., Winter P., Marell R.R., Fliser D., Heine G.H. // *Blood*. 2011. V. 118. № 12. P. 50–61.
- Ancuta P., Liu K.Y., Misra V., Wacleche V.S., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 403–422.
- Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 1–5.
- Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. // *J. Immunol. Methods*. 2012. V. 38. № 1. P. 9–13.
- Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 3. P. 1809–1815.
- Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. // *Immunol. Res.* 2012. V. 53. № 1–3. P. 41–57.
- Tabas I., Williams K.J., Borén J. // *Circulation*. 2007. V. 116. № 16. P. 1832–1844.
- Zawada A.M., Rogacev K.S., Schirmer S.H., Sester M., Böhm M., Fliser D., Heine G.H. // *Immunobiology*. 2012. V. 217. № 12. P. 1273–1284.
- Gleissner C.A., Leitinger N., Ley K. // *Hypertension*. 2007. V. 50. № 2. P. 276–283.
- Murphy A.J., Woollard K.J., Hoang A., Mukhamedova N., Stirzaker R. A., McCormick S.P., Remaley A.T., Sviridov D., Chin-Dusting J. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. № 11. P. 2071–2077.
- Ziegler-Heitbrock H.W.L., Fingerle G., Ströbel M., Schraut W., Stelter F., Schütt C., Passlick B., Pforte A. // *Eur. J. Immunol.* 1993. V. 23. № 9. P. 2053–2058.
- Luu N.T., Madden J., Calder P.C., Grimble R.F., Shearman C.P., Chan T., Tull S.P., Dastur N., Rainger G.E., Nash G.B. // *Atherosclerosis*. 2007. V. 193. № 2. P. 259–268.
- Грачева Е.В., Самовилова Н.Н., Голованова Н.К., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Тарарак Э.М., Проказова Н.В. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 3. С. 948–954.
- Грачева Е.В., Самовилова Н.Н., Голованова Н.К., Пиксина Г.Ф., Шишкина В.С., Проказова Н.В. // *Биомед. химия*. 2013. Т. 59. № 4. С. 459–468.
- Schmitz G., Orsó E. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. V. 13. № 5. P. 513–521.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. // *Glycobiology*. 2007. V. 17. № 1. P. 1R–13R.
- Hollenberg M., Fishman P.H., Bennet V., Cuatrecasas P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. № 10. P. 4224–4228.
- Parton R.G., Richards A.A. // *Traffic*. 2003. V. 4. № 11. P. 724–738.
- Moreno-Altamirano M.M.B., Aguilar-Carmona I., Sánchez-García F.J. // *Immunology*. 2007. V. 120. № 4. P. 536–543.
- Hristov M., Weber C. // *Thromb. Haemost.* 2011. V. 106. № 5. P. 757–762.
- Weber C., Belge K.U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K.S., Ziegler-Heitbrock H.W. // *J. Leukoc. Biol.* 2000. V. 67. № 5. P. 699–704.
- Pandzić Jaksic V., Gizdic B., Miletic Z., Ostovic K.T., Jaksic O. // *Coll. Antropol.* 2010. V. 34. № 1. P. 319–325.
- Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas F.W., Gabuzda D. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. № 12. P. 1701–1707.
- Koenen R.R., Weber C. // *EMBO Mol. Med.* 2011. V. 3. № 12. P. 713–725.
- Zilber M.T., Setterblad N., Vasselon T., Doliger C., Charron D., Mooney N., Gelin C. // *Blood*. 2005. V. 106. № 9. P. 3074–3081.
- Pfeiffer A., Boettcher A., Orso E., Kapinsky M., Nagy P., Bodnar A., Spreitzer I., Liebisch G., Drobnik W., Gempel K., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. № 11. P. 3153–3164.
- Cuschieri J., Sakr S., Bulger E., Knoll M., Arbabi S., Maier R.V. // *Shock*. 2009. V. 32. № 6. P. 572–577.
- Triantafilou M., Triantafilou K. // *J. Endotoxin Res.* 2003. V. 9. № 5. P. 331–335.
- Triantafilou M., Morath S., Mackie A., Hartung T., Triantafilou K. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. № 17. P. 4007–4014.
- Gracheva E.V., Samovilova N.N., Golovanova N.K., Kashirina S.V., Shevelev A., Rybalkin I., Gurskaya T., Vlasik T.N., Andreeva E.R., Prokazova N.V. // *Mol. Cell Biochem.* 2009. V. 330. № 1–2. P. 121–129.
- Bobryshev Y.V., Lord R.S., Golovanova N.K., Gracheva E.V., Zvezdina N.D., Sadovskaya V.L., Prokazova N.V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1361. № 3. P. 287–294.
- Bobryshev Y.V., Lord R.S., Golovanova N.K., Gracheva E.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. V. 1535. № 2. P. 87–99.

УДК 577.112.5

Hct-A — новое семейство актинопоринов актинии *Heteractis crispa*

Е. В. Лейченко*, М. М. Монастырская, Е. А. Зелепуга, Е. С. Ткачева, М. П. Исаева,
Г. Н. Лихацкая, С. Д. Анастюк, Э. П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022,
Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159
*E-mail: 969844@gmail.com
Поступила в редакцию 25.09.2014

РЕФЕРАТ Из тропической актинии *Heteractis crispa* комбинацией методов жидкостной хроматографии выделено несколько новых изоформ актинопоринов с молекулярными массами от 18995.5 до 19398.7 Да, обладающих высокой гемолитической активностью. Показано, что в водных растворах актинопорины существуют в виде моно-, ди- и тримеров. Установлены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих актинопорины, получены аминокислотные последовательности новых полипептидов, принадлежащих к семейству Hct-A актинопоринов. Новые актинопорины различаются величиной изоэлектрической точки, количеством и локализацией заряженных аминокислотных остатков в функционально значимом N-концевом фрагменте молекулы, а также зарядом тетрапептида (74-77 а.о.), который принимает участие в электростатическом взаимодействии с цитоплазматической мембраной. Получен рекомбинантный актинопорин rHct-A2 с молекулярной массой 19141 Да, рI 9.64 и величиной гемолитической активности 4.0×10^4 GE/мг. Показано, что проводимость ионных каналов, формируемых rHct-A2 в БЛМ, аналогична проводимости нативного актинопорина из *H. crispa*. Полученные данные расширяют знания о структурно-функциональных взаимосвязях актинопоринов и вносят вклад в понимание механизма функционирования этих молекул, что является основой для создания соединений с высоким биомедицинским потенциалом. В настоящее время их рассматривают как модели для получения противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актиния; актинопорины; гемолитическая активность; проводимость липидных мембран; структурно-функциональный анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПФТ – пороформирующие токсины; БЛМ – бислоиные липидные мембраны; а.о. – аминокислотный остаток (при числе); GST – глутатион-S-трансфераза; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Причина пристального внимания исследователей к актиниям, морским кишечнорастворимым, – продуцируемые ими яды, которые представляют собой сложные смеси биологически активных соединений белковой природы. Для дальнейшего использования в качестве фармакологических агентов наибольший интерес представляют нейротоксины (модуляторы ионных каналов Nav, ASICs и Kv), различные по структуре и механизму действия ингибиторы протеиназы и актинопорины, принадлежащие к семейству α -пороформирующих токсинов (α -ПФТ) [1-3]. Актинопорины обладают уникальной пространственной структурой, что позволяет им существовать как в водорастворимом, так и в мембраносвязанном состоянии и обуслов-

ливает их способность связываться с мембранами, содержащими сфингомиелин, и формировать в них ионные каналы или поры [4]. С пороформирующей активностью связывают широкий спектр проявляемого этими полипептидами фармакологического действия: противоопухолевого, антипаразитарного, дерматонекротического и кардиостимулирующего [5-7]. Установлено, что актинопорин EqtII из *Actinia equina* в концентрации 0.1-1 нМ оказывает кардиотоксический эффект, а при более высоких концентрациях стимулирует агрегацию тромбоцитов [8]. Показано, что в небольших концентрациях ($\sim 10^{-9}$ М) тенеброзины (актинопорины из *Actinia tenebrosa*) также действуют как кардиостимуляторы [9]. Обнаружено, что актинопорины EqtII и Bc2 из *Bunodosoma caissarum* [10] являют-

ся эффективными противоопухолевыми агентами, действующими на фибросаркому и глиобластому [11]. Недавно на клетках HeLa, TNP-1, MDA-MB-231 и SNU-C4 нами было показано, что актинопорин RTX-A из *Heteractis crisper* в нетоксичных концентрациях проявляет противоопухолевое действие, а также подавляет опухолевую трансформацию эпителиальных клеток мыши JB6P+Cl41, стимулированную эпидермальным фактором роста [7]. Установлено, что это действие обусловлено индукцией p53-независимого апоптоза и ингибированием активности онкогенных ядерных факторов AP-1 и NF-κB.

В последние годы α-пороформирующие токсины актиний используют для создания фармакологических препаратов, представляющих собой иммуноконъюгаты актинопоринов с лигандами: моноклональными антителами, гормонами или факторами роста, действие которых направлено на цитоплазматические мембраны опухолевых и/или паразитарных клеток [6]. В связи с этим актуальным представляется исследование молекулярных основ фармакологических эффектов актинопоринов.

Данная работа является продолжением структурно-функциональных исследований актинопоринов, она посвящена выделению актинопоринов из актинии *H. crisper*, установлению нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов, получению рекомбинантных аналогов и изучению некоторых аспектов механизма взаимодействия актинопоринов с биологическими мишенями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы следующих фирм: Reanal, Венгрия; Whatman, Англия; ICN Biochemicals, Sigma, Invitrogen, Thermo Scientific, США; Fermentas, Литва; Merk, Германия; «Криохром», «Сибэнзим», «Хеликон», «Евроген», Россия.

Биологический материал

Актинии *H. crisper* были собраны на литорали Южно-Китайского моря во время научной экспедиции на НИС «Академик Опарин» в 2007 г. Видовая принадлежность актиний была определена Е.Е. Костиной (ИБМ ДВО РАН, г. Владивосток). Образцы актиний были заморожены и хранились при -20°C .

Выделение и очистка полипептидов

Приготовление водного экстракта, осаждение суммарных фракций водорастворимых белков ацетоном (63%) осуществляли по методике, описанной ранее [12]. Все операции проводили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Ионообменную хроматографию полипептидов проводили на колонке (2.6×50 см) с целлюлозой КМ-32,

уравновешенной 0.01 М аммоний-ацетатным буферным раствором, pH 6.0, в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М, общий объем 2 л) в рабочем буферном растворе. Скорость элюции составляла 20 мл/ч, объем фракций – 5 мл.

Гель-фильтрацию полипептидов проводили на колонке Superdex Peptide 10/30, уравновешенной 0.1 М аммоний-ацетатным буферным раствором, pH 6.0, на высокоэффективном хроматографе среднего давления FPLC (AKTAsistem Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили со скоростью 3 мл/мин. Объем фракций составил 1.5 мл.

ВЭЖХ полипептидов осуществляли на колонке с обращенной фазой сорбента Nucleosil C₁₈ (4.6×250 мм), уравновешенной 10% ацетонитрилом в 0.1% трифторуксусной кислоте, на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Элюирование проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 90% в 0.1% трифторуксусной кислоте при pH 2.2 в течение 60 мин. Скорость элюции – 0.5 мл/мин. Для упаривания ацетонитрила использовали вакуумный концентратор Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Клонирование генов актинопоринов

кДНК синтезировали на основе суммарной мРНК, выделенной из щупалец актинии *H. crisper* [14]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие зрелые актинопоринны, были амплифицированы с помощью ген-специфичных праймеров 5'-TCGTTACc/aATGATA-3' (*hct₁sign*) и 5'-GATTCTCTATTTGTCTTC-3' (*hct₁notransl*), сконструированных в программе Vector NTI 8 (Invitrogen, США) на основе последовательностей известных генов актинопоринов. Праймеры были синтезированы в НПО «Евроген» (г. Москва). ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) при следующих условиях: 94°C – 5 мин; затем 28 циклов: 94°C – 30 с, 59°C – 45 с, 72°C – 45 с; затем 72°C – 15 мин. ПЦР-фрагменты (650 п.н.) выделяли из агарозного геля с помощью набора DNA Extraction Kit (Thermo Scientific, США) и клонировали в pTZ57R/T, используя систему T/A cloning (Thermo Scientific, США). Рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки штамма DH5a *Escherichia coli*. Клоны отбирали при помощи сине-голубой селекции на среде LB, содержащей X-Gal и ИПТГ. Присутствие в отобранных клонах нужной вставки определяли с помощью метода ПЦР «на колониях» со стандартными праймерами.

Установление и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочно-го лизиса [15]. Определение нуклеотидных последовательностей вставок проводили на ДНК-анализаторе ABI3130xl (Applied Biosystems, США). [16]. Нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности анализировали с помощью пакета программ Vector NTI 8 (Invitrogen, США).

Экспрессия генов актинопорина

Для создания экспрессионной конструкции фрагмент ДНК, кодирующий актинопорин, амплифицировали с помощью Vent-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Россия) и ген-специфичных праймеров: *hct-a(f)* (5'-GGCTTTAGCTGGTACAATTATCGCGGGTGCA-3') и *hct-a(r)* (5'-CCCSAAGCTTAGCGTGAGATCT-TAATTTGCAGTAT-3'). Для сохранения эндопептидазного сайта и корректной вставки гена в вектор рЕТ-41a(+) (Novagen, США) на 5'-конец прямого праймера был добавлен dGMP, а в состав обратного праймера введен сайт рестрикции для HindIII, совмещенный со стоп-кодоном, а также четыре дополнительных нуклеотида для эффективной работы рестриктазы. ПЦР проводили при следующих условиях: 94°C – 5 мин; затем 30 циклов: 94°C – 30 с, 65°C – 45 с, 72°C – 45 с; затем 72°C – 15 мин. В качестве матрицы использовали рTZ57R/T со вставкой гена *hct-a2*. ПЦР-фрагмент обрабатывали рестриктазой HindIII, клонировали в вектор рЕТ-41a(+) по сайтам рестрикции PshAI и HindIII. Рекомбинантные плазмиды выделяли и секвенировали. Плазмиды с правильной вставкой использовали для трансформации клеток штамма Rosetta (DE3) *E. coli* путем электропорации на приборе Multiporator (Eppendorf, Германия). Трансформированные клетки культивировали в среде 2xYT, содержащей антибиотики канамицин (50 мкг/мл) и хлорамфеникол (34 мкг/мл), в течение ночи, после чего культуру наращивали в объеме 100 мл до светопоглощения $A_{600} = 0.5-0.6$. Для индукции экспрессии добавляли ИПТГ (Fermentas, Литва) в конечной концентрации 0.1 мМ и продолжали наращивать клетки в течение 3 ч при температуре 30°C для получения гибридного белка в растворимой форме. Затем клетки центрифугировали (8000 об/мин) и промывали буферным раствором 1 × PBS.

Выделение рекомбинантного актинопорина

Клетки, содержащие гибридный белок, ресуспендировали в 1 × PBS (1 : 5 по объему) и обрабатывали ультразвуком на приборе Sonopuls HD 2070 (Bandelin Electronic, Германия) для разрушения клеточной оболочки. После центрифугирования

(10000 об/мин) клеточный лизат наносили на Ni²⁺-САМ-агарозу, инкубировали в течение 10 мин (+4°C) при постоянном перемешивании для связывания гибридного белка с носителем. Для удаления белков клеточного лизата Ni²⁺-САМ-агарозу с гибридным белком промывали буферным раствором (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 8.0), а затем буферным раствором для реакции с энтеропептидазой (20 мМ Трис-HCl, 50 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, pH 8.0). К гибриднему белку добавляли энтеропептидазу (New England BioLabs, Великобритания) из расчета 1 ед. фермента на 20 мкг гибридного белка и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение ночи при постоянном перемешивании. После осаждения Ni²⁺-САМ-агарозы центрифугированием при 3000 об/мин фракцию, содержащую рекомбинантный актинопорин, отбирали и инкубировали с STI-агарозой для удаления энтеропептидазы.

Электрофоретический анализ

Электрофорез проводили по методу Лэммли [17] в вертикальных пластинах (9 × 12 × 1 мм) в 15% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия (ДСН). Молекулярные массы оценивали с использованием стандартного набора белков-маркеров PageRuler™ Unstained protein ladder, 10–200 кДа (Fermentas, Литва).

Масс-спектрометрический анализ

Молекулярные массы полипептидов определяли на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonic, Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора.

Гемолитическая активность

Гемолитическую активность определяли на эритроцитах мыши в среде, содержащей 0.9% NaCl. Уровень гемоглобина в супернатанте измеряли спектрофотометрически при 540 нм после предварительного быстрого охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования для осаждения эритроцитов и их теней. За одну гемолитическую единицу (ГЕ) принимали количество белка, вызывающее гемолиз 50% эритроцитов в 1 мл 0.7% суспензии, за 30 мин при 37°C.

Результаты, обработанные по правилам вариационной статистики с использованием пакета программ MS Office Excel 2007, представлены как средние значения, полученные из шести независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между показателями оценивали по однопараметрическому тесту ANOVA.

Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность N-концевого фрагмента рекомбинантного актинопорина определяли на автоматическом твердофазном аминокислотном секвенаторе белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США) по программе производителя, используя образец белка на pvdf-мембране. Рекомбинантный белок был перенесен из полиакриламидного геля на 0.45 мкм pvdf-мембрану (Millipore, США) в буферном растворе, содержащем 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% метанол, 0.1% ДСН, pH 8.3, при 26 В, 60 мА, в течение ночи с использованием Mini Trans-Blot® камеры (Bio-Rad, США). Мембрану окрашивали 0.04% Coomassie Brilliant Blue G-250 в 10% (по объему) ледяной уксусной кислоте, затем отмывали от красителя 50% (по объему) метанолом и высушивали в термостате при 37°C.

Получение бислойных липидных мембран

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали на отверстиях тефлонового стаканчика диаметром 0.25 мм по методу Мюллера [18] из 1% раствора моноолеина в *n*-гептане, содержащего заданные концентрации сфингомиелина. Водная фаза: 0.1 М или 1 М NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.5. Актинопорины RTX-A (5 нг/мл) и Hct-A2 (50 нг/мл) добавляли в водную фазу до формирования БЛМ.

Измерение электрических характеристик БЛМ

Ток через БЛМ измеряли высокоомным вольтметр-электронметром ВК2-16 в режиме фиксации потенциала на мембране с помощью хлорсеребряных электродов (потенциал асимметрии 2-3 мВ). Регистрацию тока на выходе усилителя осуществляли потенциометром КПС-4.

Гомологичное моделирование актинопорин

Модели пространственной структуры актинопорин были генерированы методом гомологичного моделирования с помощью веб-сервера SWISS-MODEL [19] и программы Swiss-PdbViewer [20]. В качестве прототипа при построении модели использовали пространственную структуру стихолизина StnII (PDB ID 1GWY) [21] актинии *Stichodactyla helianthus*, полученную из Protein Data Bank [22]. Оценку электростатических свойств молекулярной поверхности в силовом поле Amber ff12 и визуализацию структур выполняли с помощью программы MOE [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно опубликованным данным, нативные актинопорин обычно выделяют из водных экстрактов цельных животных и дальнейшую их очистку про-

водят комбинацией различных методов жидкостной хроматографии [4, 12, 24, 25]. В данной работе для выделения индивидуальных актинопорин использовали метод их осаждения из водного экстракта актинии *H. crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) ацетоном и разделение компонентов полученного суммарного белкового препарата с помощью катионообменной хроматографии, FPLC гель-фильтрации и ОФ ВЭЖХ.

На рис. 1А приведен профиль элюции суммарного белкового препарата, полученный в результате хроматографии на целлюлозе КМ-32. Полипептиды фракции 2 обладали высокой гемолитической активностью, а фракции 1 и 3 имели более низкую активность. Полипептиды фракции 2 были рехроматографированы в тех же условиях. Последующую очистку актинопорин проводили методом гель-фильтрации (рис. 1Б). В результате были получены гемолитически активные фракции, содержащие от 50 до 500 мкг белка. Согласно данным электрофоретического анализа эти фракции содержали полипептиды с молекулярной массой около 19–20 кДа. Полипептиды фракций 1-3 подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (рис. 1В-Д соответственно). В результате были получены как фракции гомогенных полипептидов (рис. 1Г), так и фракции, содержащие несколько полипептидов (рис. 1В,Д) с молекулярной массой от 18995.5 до 19398.7 Да, согласно данным масс-спектрометрического анализа. Очевидно, что в суммарных фракциях актинопорин представлены множеством изоформ с очень близкими физико-химическими свойствами и, вероятно, с этим связано уширение пиков при хроматографическом разделении этих полипептидов.

Из *H. crispa* нами ранее были выделены и охарактеризованы актинопорин RTX-A, RTX-S и RTX-SII, а также определены нуклеотидные последовательности генов и получены 18 аминокислотных последовательностей актинопорин семейства Hct-S, содержащих N-концевой остаток серина [12, 14, 25, 26]. Экспериментальные значения молекулярных масс выделенных актинопорин лежат в пределах от 18995.5 до 19398.7 Да и согласуются с расчетными значениями для семейства Hct-S (от 19338 до 19518 Да), что свидетельствует о существовании множества изоформ актинопорин не только на геномном или транскриптомном, но и на трансляционном уровне. Наличие в масс-спектрах сигналов меньшей интенсивности в области 38543 и 57950 м/з показывает, что актинопорин существуют в водных растворах также в форме димеров и/или тримеров соответственно, что согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее для StnII из *S. helianthus* [27].

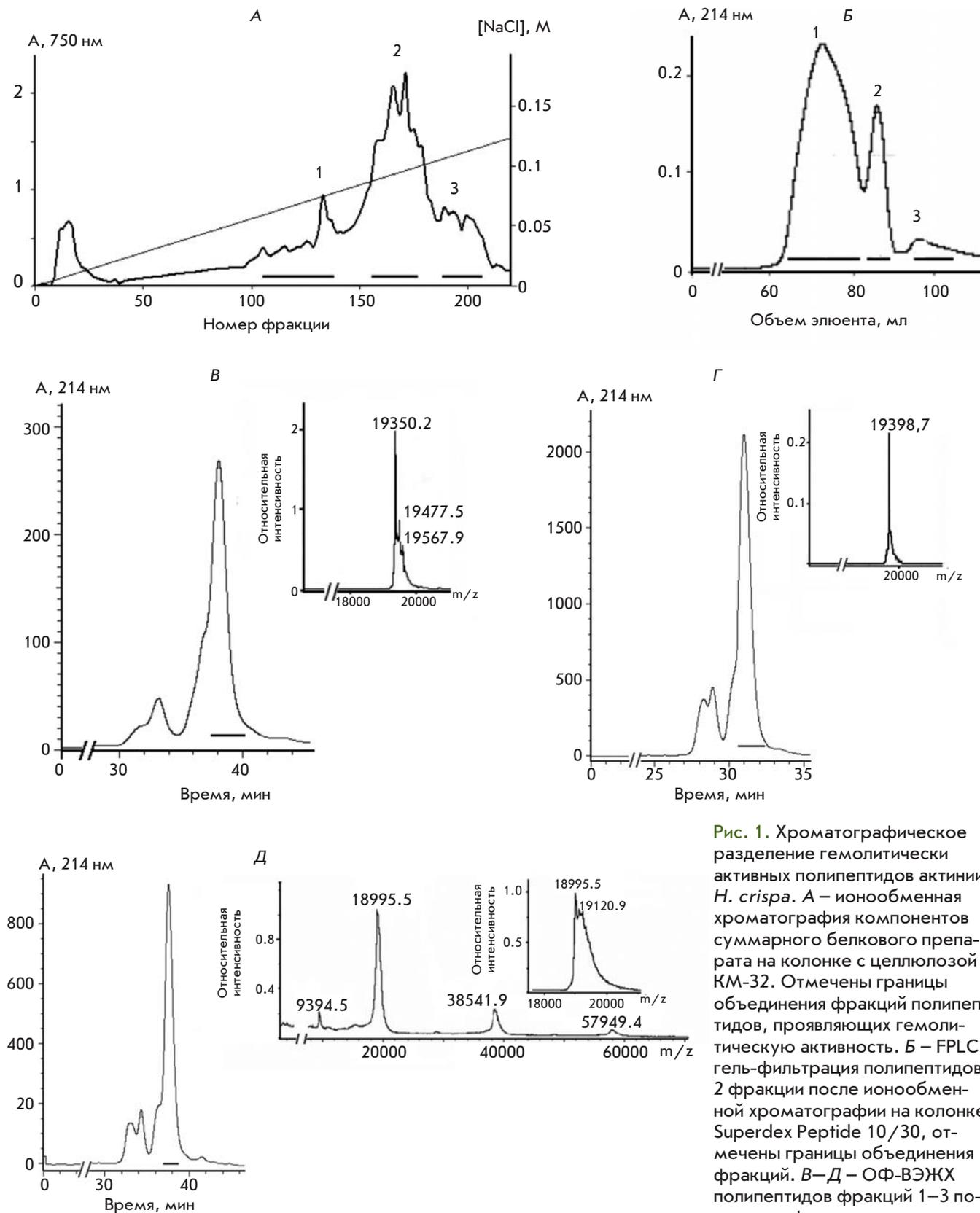


Рис. 1. Хроматографическое разделение гемолитически активных полипептидов актинии *H. crista*. А – ионообменная хроматография компонентов суммарного белкового препарата на колонке с целлюлозой КМ-32. Отмечены границы объединения фракций полипептидов, проявляющих гемолитическую активность. Б – FPLC гель-фильтрация полипептидов 2 фракции после ионообменной хроматографии на колонке Superdex Peptide 10/30, отмечены границы объединения фракций. В–Д – ОФ-ВЭЖХ полипептидов фракций 1–3 после гель-фильтрации на колонке Nucleosil C₁₈ и масс-спектры полученных соединений

	β1		α1		β2		β3		β4		β5		β6	
	SSS	HHH	HHHH	HHHHH	SSSSSSSS	SSSSSS	SS S	SS	SS	SSSSSS	SSSSSS	SSSSSS	SSSSS	SSSSS
	10	20	30	40	50	60	70	80	90					
RTX-A	--ALAGAIIA	GASLTFQILD	KVLAEELGQVS	RKIAIGIDNE	SGGSWTAMNA	YFRSGTDDVI	LPEFVFNQKA	LLYSGRKNRG	PDTTGAVGAL					
Hct-A2	---T...	...G...	...G...K...	...V...	...L...	...DT...	...VA...	...AF						
Hct-A3	---T...	...G...	...G...K...	...V...	...L...	...DT...	...VA...	...AF						
Hct-A4	---T...	...K...	...E...G...K...	...V...V...	...L...	...DT...	...EA...	...AF						
Hct-A6	---T...	...K...	...E...G...K...	...V...A...	...L...	...DT...	...EA...	...AF						
Hct-A5	---T...	...K...	...E...G...K...	...V...V...	...L...	...DT...	...EA...	...AF						
Hct-S3	SA...T...E	...G...	...G...K...	...V...	...L...	...DT...	...VA...	...AF						
Hct-S5	SA...T...	...K...	...E...G...K...	...V...V...	...L...	...DT...	...EA...	...AF						
Hct-S6	SA...T...	...K...	...E...G...K...	...V...V...	...L...	...DT...	...EA...	...AF						
Hct-S7	SA...T...TE	...G...	...G...K...	...V...	...L...	...DT...	...VA...	...AF						
HMGIII	SA...T...E	...G...	...G...K...	...V...V...	...L...	...DT...	...VA...	...AF						
StnI	-SE...T...D	...EV...	...G...K...	...V...	...T...L...	...V...T...	...SS...	...VA...	...AF					
StnII	---T...	...V...	...E...K...	...V...	...T...L...	...T...	...DT...	...VA...	...AF					
EqfII	SADV...V...D	...S...D...K	T...EA...N...K	...V...V...	...KT...L...T	...S...IV	...HK...HG...	...N...Q...D...	...VA...	...V				
EqfIV	SV...V...K	...A...NV...Q	T...KA...DI	...V...V...	...KT...L...T	...S...IV	...HK...HG...	...N...Q...D...	...VA...	...V				
EqfV	SV...V...K	...A...NV...Q	T...KA...DI	...V...V...	...KT...L...T	...S...IV	...HK...HG...	...N...Q...D...	...VA...	...V				

	β7		β8		α2		β9		β10		β11		β12	
	SSSS	SSS	SSSSSS	SSSSS	SSS	H	HHHHHHH	SS	SS	SSSSS	SSS	SSSS	SS	SSSSSS
	100	110	120	130	140	150	160	170	180					
RTX-A	AYYMSNGNTL	GVMFVSPFDY	NLYSNWWDVK	VYSGKRRADQ	AMYEDLYY-S	NPYRGDNGWH	QKNLGYGLKM	KGIMTSAGEA	IMEIRISR-	[175]				
Hct-A2	...H...	...F...	...I...	...G...M...-G	...RV	...LQ...K...	...[175]							
Hct-A3	...H...	...F...	...I...	...G...M...-G	...R...R...	...LQ...K...	...[175]							
Hct-A4	...D...	...S...	...I...	...G...M...-G	...LQ...K...	...[175]								
Hct-A6	...D...	...I...	...G...M...-G	...LQ...K...	...[175]									
Hct-A5	...D...	...I...	...G...M...-G	...LQ...K...	...[175]									
Hct-S3	...H...	...F...	...I...	...G...M...-G	...R...	...LQ...K...	...[177]							
Hct-S5	...D...	...I...	...G...M...-G	...LQ...K...	...[177]									
Hct-S6	...D...	...I...	...G...M...-G	...MLQ...K...	...[177]									
Hct-S7	...H...	...F...	...I...	...G...M...-G	...R...	...LQ...K...	...[177]							
HMGIII	...H...	...F...	...I...	...G...M...-G	...R...	...LQ...K...	...[177]							
StnI	...S...	...W...	...I...P...	...G...M...-G	...Y	...K...Q...K...	...[176]							
StnII	...S...	...W...	...I...	...G...M...-G	...E...	...R...	...K...Q...K...	...[175]						
EqfII	...L...D...	...A...L...Y...	...W...N...R	...I...K...	...R...E...NL	...S...F...	...TR...	...S...R...F...N...S...H...	...L...HV...KA	...[179]				
EqfIV	...A...D...	...A...L...Y...	...W...N...R	...IFK...R...	...R...Q...YL	...S...F...	...ERH...	...S...R...F...N...G...Q...	...L...HVTKA	...[179]				
EqfV	...A...D...	...A...L...Y...	...W...N...R	...IFK...R...	...R...Q...YL	...S...F...	...ERH...	...S...R...F...N...G...Q...	...L...HVTKA	...[179]				

Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей актинопоринов. RTX-A, RTX-SII, Hct-As, Hct-Ss – актинопорины *H. crispa*; HMGIII – магнификализин *Heteractis magnifica* (Swiss-prot, Q9U6X1); StnI, StnII – стихолизины *S. helianthus* (Swiss-Prot, P81662, P07845); EqfII, EqfIV, EqfV – эквинатоксины *A. equina* (Swiss-Prot, P61914, Q9Y1U9, Q93109). Идентичные остатки отмечены точками; длина α-спиралей и β-тяжей соответствует структуре StnII и показана буквами H и S соответственно

Следует заметить, что отличительной особенностью первичной структуры актинопорина RTX-A, выделенного из *H. crispa* (19273 Да), является отсутствие первых двух N-концевых аминокислотных остатков [12]. Согласно расчетным значениям молекулярных масс актинопоринов семейства Hct-S (от 19338 до 19518 Да) и значениям, определенным для актинопоринов MALDI TOF масс-спектрометрией (от 18995.5 до 19398.7 Да), можно предположить существование еще одного семейства актинопоринов с меньшими значениями молекулярных масс и, вероятно, с остатком аланина на N-конце молекулы.

Клонирование генов актинопоринов

Для определения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих зрелые актинопорины актинии *H. crispa*, были сконструированы пря-

мой (*hct_sign*) и обратный (*hct_notransl*) праймеры. Праймер *hct_sign* создан на основе анализа сигнальных последовательностей известных актинопоринов, а ген-специфичный обратный праймер *hct_notransl* – на основе ранее полученной информации о 3'-нетранслируемой области *rtx-a* и *rtx-sii* *H. crispa* [28].

В результате ПЦР, клонирования, секвенирования и анализа ПЦР-фрагментов были получены 17 последовательностей генов актинопоринов, пять из которых кодировали актинопорины нового семейства Hct-A (Hct-A2-Hct-A6), а 12 – актинопорины семейства Hct-S, установленного нами ранее (*рис. 2*) [26]. Идентичность нуклеотидных последовательностей составила от 93 до 99%, а аминокислотных последовательностей – от 88 до 99%. Наиболее представленными оказались Hct-A2-Hct-A4, Hct-S3, Hct-S5 и Hct-S6.

Расчетные молекулярные массы актинопоринов семейств Hct-A и Hct-S составили от 19158

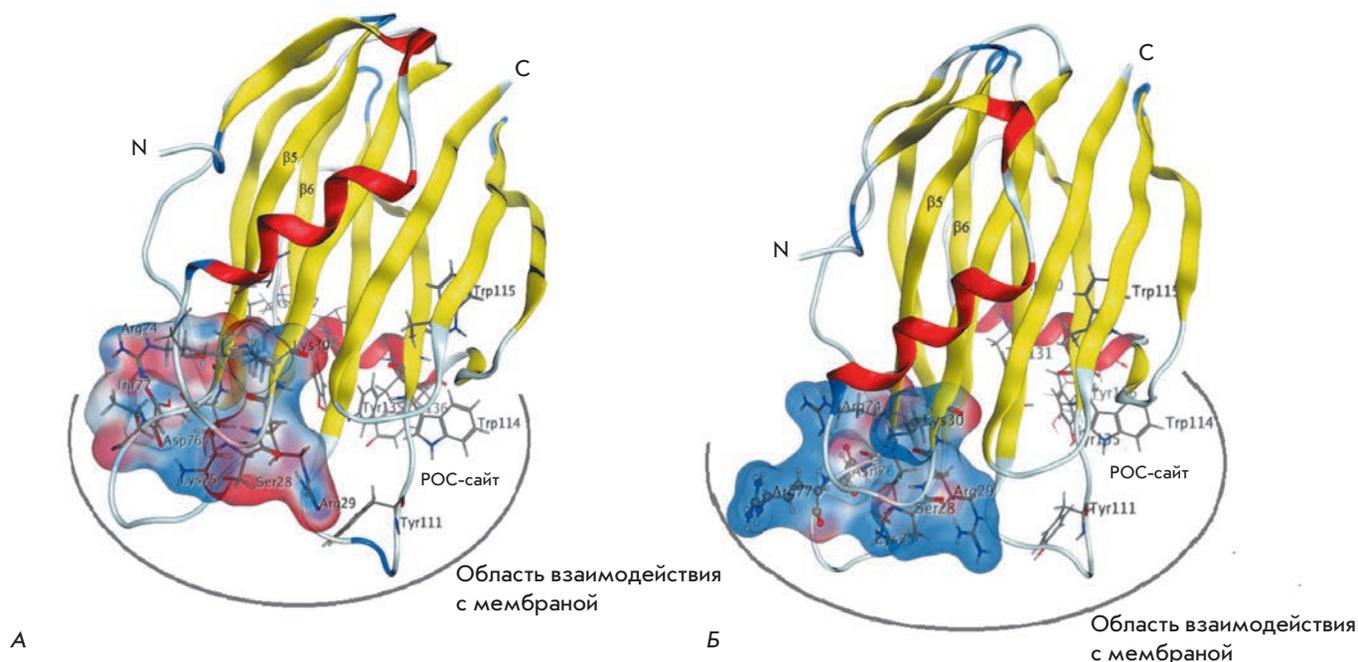


Рис. 3. Модели пространственной структуры актинопоринов Hct-A2 и Hct-A6. Модели пространственной структуры актинопоринов Hct-A2 (А) и Hct-A6 (Б) представлены в виде ленточной диаграммы и окрашены согласно элементам вторичной структуры. Аминокислотные остатки, формирующие РОС-сайт связывания, «псевдожесткую» петлю 28SRK30, а также остатки с заряженной боковой цепью на петле, соединяющей β 5- и β 6-тяжи, представлены в виде стержневой модели; аминокислотные остатки Asn76 и Arg77 актинопорина Hct-A6 представлены в виде шаростержневой модели. Вариабельные участки молекулярной поверхности окрашены согласно электростатическим свойствам: положительно заряженные – синим, а отрицательно заряженные – красным. Визуализация выполнена с помощью программы MOE [23]

до 19518 Да, что соответствует нативным актинопоринам *H. crista*, *A. equina*, *S. helianthus*, *H. magnifica*, *Phyllodiscus semoni* [12, 24–32]. Все представители семейств Hct-A и Hct-S являются высокоосновными полипептидами, расчетные значения их изоэлектрических точек лежат в диапазоне 9.10–9.74, что характерно для актинопоринов *H. crista*, а также для большинства известных представителей актинопоринов из других видов актиний.

Согласно полученным данным, в ткани щупалец *H. crista*, как и актиний *A. equina* [29, 33], *H. magnifica* [34], *S. helianthus* [24, 35], синтезируется целый ряд изоформ актинопоринов, кодируемых мультигенными семействами. Актинопорины различаются единичными аминокислотными заменами (рис. 2), большинство из которых находится в функционально значимом амфифильном N-концевом фрагменте молекулы (1–27 а.о.), участвующем в порообразовании и связанным с β -кором высокозаряженной петлей S/KRK30 [21, 28, 36]. Все представители актинопоринов характеризуются высокой консервативностью аминокислотных остатков, входящих в ароматический РОС-сайт связывания с мем-

браной (104–137 а.о.), а также остатка Lys77, локализованного на петле, соединяющей β 5- и β 6-тяжи (76–79 а.о.). Этот остаток, как показано для EqтII, участвует в процессе олигомеризации мономеров [37].

In silico-анализ заряженных аминокислотных остатков в области взаимодействия актинопоринов с мембраной

К настоящему времени установлено, что в основе молекулярного механизма порообразования лежит электростатическое притяжение положительно заряженной молекулы актинопорина к противоположно заряженной цитоплазматической мембране и специфическое взаимодействие РОС-сайта связывания с фосфорилхолиновой головкой сфингомиелина [5, 21, 28, 36]. Происходящая затем конформационная перестройка N-концевого фрагмента молекулы приводит сначала к его переходу в водно-липидный интерфейс и затем к включению в гидрофобный кор мембраны. Процесс сопровождается олигомеризацией трех-четырех или девяти молекул мономера [27, 38–40]

Для определения локализации функционально важных участков актинопоринов семейства Hct-A

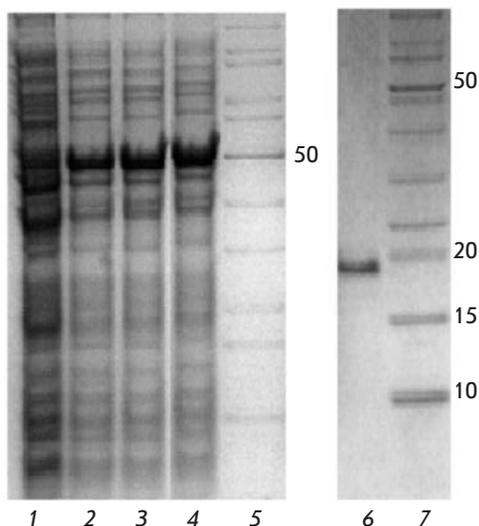


Рис. 4. Электрофореграммы белков клеточного лизата после экспрессии рЕТ-41а(+)-*hct-a2* без добавления ИПТГ (1); после экспрессии рЕТ-41а(+)-*hct-a2* с добавлением ИПТГ в концентрации 0.1, 0.5 и 1.0 мМ (2–4 соответственно); и рекомбинантного актинопорина rHct-A2 (6); 5, 7 – маркеры молекулярной массы, кДа

(Hct-A2–Hct-A6) были построены модели их пространственных структур. В качестве прототипа использовали кристаллическую структуру StnII (PDB, 1gwyA), выполненную с наивысшим разрешением 1.71 Å (идентичность последовательностей составляет от 90.29 до 99.43%). Полученные модели 3D-структуры актинопоринов содержат по 12 β-тяжей, образующих β-кор, и по две α-спирали, расположенные на N- и C-концах молекулы. Антипараллельные β-тяжи соединены между собой и с α-спиральными фрагментами молекулы петлями различной протяженности (рис. 3), включающимися при порообразовании в мембранный интерфейс [40]. Величина RMSD для 175 Cα-атомов модели относительно прототипа составила 0.27 Å.

В представленной работе проведен анализ вариаций заряженных остатков в области взаимодействия актинопоринов с мембраной. Картирование на молекулярной поверхности этих молекул изменений ее электростатических свойств показало, что несмотря на высокую консервативность расположения заряженных остатков в структуре актинопоринов, на петле 74–83, соединяющей β5- и β6-тяжи, расположен вариабельный участок (рис. 2 и 3). Согласно данным криоэлектронной микроскопии эта петля, локализованная, как и ROC-сайт связывания, на поверхности контактов актинопо-

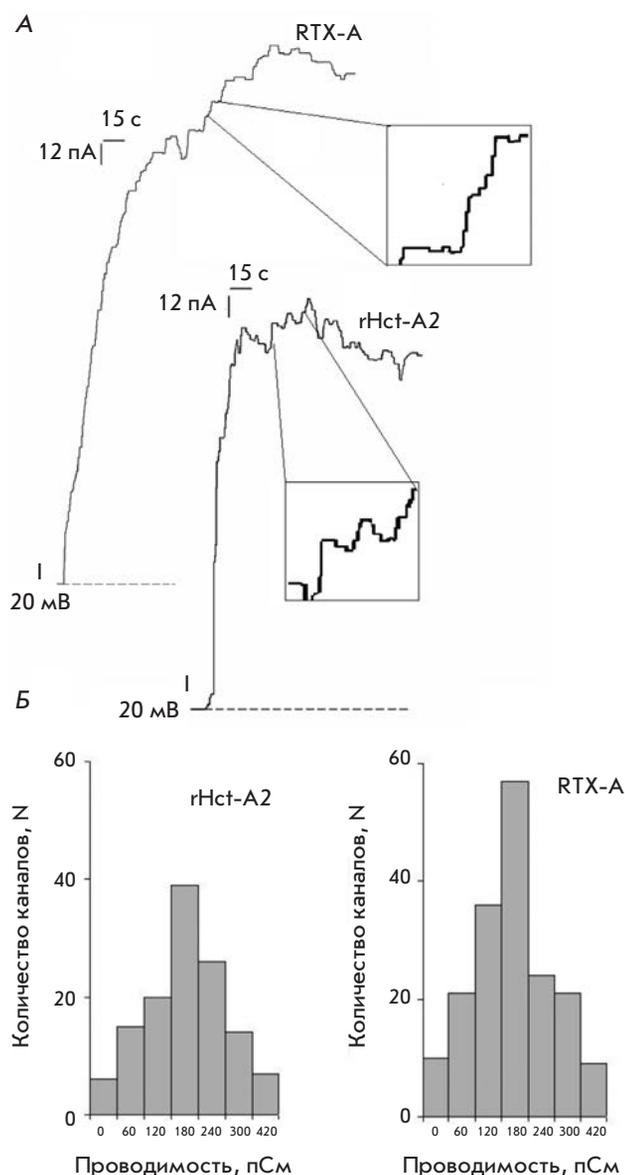


Рис. 5. Результаты исследования каналаобразующей активности актинопоринов на БЛМ. А – проводимость БЛМ, индуцированная актинопоринами *H. crispa*: rHct-A2 (50 нг/мл) и RTX-A (5 нг/мл). Мембранный потенциал – 20 мВ. Б – гистограммы проводимости мембран, модифицированных актинопоринами, rHct-A2 и RTX-A

ринов с липидным интерфейсом, играет важную роль как в распознавании, так и во взаимодействии с мембраной [21]. Показано, что замена нейтрального остатка Thr на положительно заряженный остаток Arg в положении 77 и отрицательно заряженного Asp на Asn в положении 76 у трех представителей семейства Hct-A4–Hct-A6 значительно увеличивает плотность положительного заряда в данной об-

ласти (рис. 3). На наш взгляд, это должно привести к сильному электростатическому взаимодействию как данной петли, так и соседней, высокозаряженной «псевдожесткой» петли SRK (28–30 а.о.), с поверхностью мембраны. Очевидно, именно эти электростатические взаимодействия способствуют, в свою очередь, конформационной реорганизации N-концевого фрагмента и последующей его дислокации и включению в мембрану.

Получение рекомбинантного актинопорина и исследование его свойств

Большое количество изоформ актинопоринов в одном виде-продуценте создает определенные трудности для получения гомогенных полипептидов в достаточном для проведения структурно-функциональных исследований количестве. С целью получения индивидуальных актинопоринов были подобраны условия экспрессии их генов в бактериальной системе и разработана схема их выделения в рекомбинантной форме.

Для создания конструкции, экспрессирующей ген актинопорина, была выбрана рЕТ-система, в частности, плазмидный вектор рЕТ-41a(+), предназначенный для экспрессии в *E. coli* целевых белков, слитых с белком-носителем – глутатион-S-трансферазой (GST). На основе последовательностей генов, кодирующих зрелые актинопорины семейства Hct-A, были сконструированы ген-специфичные праймеры *hct-a(f)* и *hct-a(r)*, фланкирующие ген *hct-a2* с 5'- и 3'-концов соответственно. В качестве матрицы для ПЦР использовали рекомбинантную плазмиду рTZ57R, содержащую ген *hct-a2*. В результате ПЦР был получен фрагмент (550 п.н.), который встроили в плазмиду по PshAI- и HindIII-сайтам. Рекомбинантные плазмиды с нужной вставкой использовали для трансформации штамма Rosetta (DE3) *E. coli*. Рекомбинантный актинопорин был получен в виде слитого с GST гибридного белка с полигистидиновым «хвостом» (GST-His6-rHct-A2). По данным электрофоретического анализа молекулярная масса гибридного белка была чуть более 50 кДа (рис. 4), что согласуется с расчетными данными (~52 кДа). GST-His6-rHct-A2 был обнаружен также в культуральной среде, но в меньшем количестве. ИПТГ в концентрации 0.1–1.0 мМ практически не влиял на выход рекомбинантного белка. Рекомбинантный актинопорин rHct-A2 с молекулярной массой около 20 кДа был выделен из клеточного лизата в нативных условиях с помощью аффинной хроматографии (рис. 4). Выход актинопорина составил в среднем 4 мг/л. В результате секвенирования была определена N-концевая аминокислотная последовательность (15 а.о.), которая полностью соответствовала выведенной на основании нуклеотидной

последовательности. Расчетная молекулярная масса rHct-A2 составила 19141 Да, а изоэлектрическая точка – 9.64. Гемолитическая активность rHct-A2 составила 4.0×10^4 ГЕ/мг, что сравнимо с активностью актинопоринов как *H. crispus* [12, 25, 26], так и других видов актиний [4, 5, 9, 24, 29].

В результате определения каналобразующей активности рекомбинантного актинопорина на БЛМ, сформированных из моноолеина и сфингомиелина (1 : 3), было установлено, что rHct-A2 в концентрации 50 нг/мл вызывает дискретные флуктуации тока в мембране, что свидетельствует о появлении в ней проводящих структур – ионных каналов (рис. 5А). Наиболее вероятная величина проводимости каналов, индуцированных rHct-A2 в 0.1 М NaCl при pH 7.5, составила 180 ± 30 пСм, что соответствует проводимости каналов, формируемых нативным RTX-A (рис. 5Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно фармакологическим исследованиям актинопоринов, их биологическая активность определяется неспецифическим действием, приводящим к увеличению проницаемости мембран, что может стимулировать различные токсические эффекты в клетках. Фактически увеличение клеточной проницаемости, вызываемое актинопоринами, приводит к глубоким изменениям морфологии клетки и ее органелл, клеточной фрагментации [5], а также к увеличению размера клеток и их гибели [41, 42]. Структурно-функциональные исследования актинопоринов, как и многих других токсинов, направлены, в конечном итоге, на определение их фармакологической активности и терапевтического потенциала. В настоящее время α -ПФТ актиний рассматривают как модели для дизайна противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов [43, 44]. Созданные природой уникальные соединения, по-видимому, могут найти успешное применение в качестве лекарственных препаратов (или основы для создания препаратов) в сочетанной терапии онкозаболеваний и/или различных кардио- и цитопатологий. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам ТИБОУ ДВО РАН О.В. Черникову за секвенирование N-концевой аминокислотной последовательности и К.В. Гузеву за секвенирование нуклеотидных последовательностей.

Работа поддержана комплексной программой фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» 42П. Получение и исследование свойств рекомбинантного актинопорина выполнено за счет средств гранта РФ (проект № 14-25-00037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parker M.W., Feil S.C. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. V. 88. № 6202. P. 91–142.
2. Chi V., Pennington M.W., Norton R.S., Tarcha E.J., Londono L.M., Sims-Fahey B., Upadhyay S.K., Lakey J.T., Iadonato S., Wulff H., et al. // *Toxicol.* 2012. V. 59. № 4. P. 529–546.
3. Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10. № 8. P. 1812–1851.
4. Turk T.J. // *Toxicol. Toxin. Rev.* 1991. V. 10. P. 223–262.
5. Anderluh G., Maček P. // *Toxicol.* 2002. V. 40. № 2. P. 111–124.
6. Tejuca M., Anderluh G., Dalla Serra M. // *Toxicol.* 2009. V. 54. № 8. P. 1206–1214.
7. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.-O., Kwak J.-Y., Bode A.M., Dong Z., et al. // *Toxicol.* 2010. V. 55. № 4. P. 811–817.
8. Batista U., Maček P., Sedmak B. // *Cell Biol. Int. Rep.* 1990. V. 14. № 11. P. 1013–1024.
9. Norton R.S., Bobek G., Ivanov J.O., Thomson M., Beer E.F., Mortiz R.L., Simpson R.J. // *Toxicol.* 1990. V. 28. № 1. P. 29–41.
10. Migues P.V., Leal R.B., Mantovanni M., Nicolau M., Gabilan N.H. // *NeuroReport.* 1999. V. 10. № 1. P. 67–70.
11. Soletti R.C., Alves T., Vernal J., Terenzi H., Anderluh G., Borges H.L., Gabilan N.H., Moura-Neto V. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. № 4. P. 1209–1215.
12. Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.V., Shwets T.V., Kozlovskaya E.P. // *Toxicol.* 2002. V. 40. № 8. P. 1197–1217.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
14. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., Issaeva M., Leychenko E., Guzev K., Monastyrnaya M., Lukyanov S., Kozlovskaya E. // *Toxicol.* 2006. V. 47. № 5. P. 517–520.
15. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning. Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 1.31–1.58.
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
17. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Muller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. // *J. Phys. Chem.* 1963. V. 67. P. 534–535.
19. Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis.* 1997. V. 18. № 15. P. 2714–2723.
20. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. // *Electrophoresis.* 2009. V. 30. Suppl 1. P. S162–173.
21. Mancheño J.M., Martín-Benito J., Martínez-Ripoll M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. // *Structure.* 2003. V. 11. № 11. P. 1319–1328.
22. <http://www.rcsb.org/>
23. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2014.
24. Lanio M.E., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gómez T., Pazos F., Besada V., Martínez D., Huerta V., Padrón G., et al. // *Toxicol.* 2001. V. 39. № 2–3. P. 187–194.
25. Klyshko E.V., Issaeva M.P., Monastyrnaya M.M., Il'ina A.P., Guzev K.V., Vakorina T.I., Dmitrenok P.S., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. // *Toxicol.* 2004. V. 44. № 3. P. 315–324.
26. Ткачева Е.С., Лейченко Е.В., Монастырская М.М., Исаева М.П., Зелепуга Е.А., Анастюк С.Д., Дмитренко П.С., Козловская Э.П. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 10. С. 1387–1397.
27. Alegre-Cebollada J., Cuniatti M., Herrero-Galán E., Gavilanes J.G., Martínez-del-Pozo A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 4. P. 920–930.
28. Monastyrnaya M., Leychenko E., Issaeva M., Likhatskaya G., Zelepuga E., Kostina E., Trifonov E., Nurminski E., Kozlovskaya E. // *Toxicol.* 2010. V. 56. № 8. P. 1299–1314.
29. Maček P., Lebez D. // *Toxicol.* 1981. V. 19. № 2. P. 233–240.
30. Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 220. № 2. P. 437–442.
31. Samejima Y., Yanagisawa M., Aoki-Tomomutsu Y., Iwasaki E., Ando J., Mebs D. // *Toxicol.* 2000. V. 38. № 2. P. 259–264.
32. Nagai H., Oshiro N., Takuwa-Kuroda K., Iwanaga S., Nozaki M., Nakajima T.A. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. V. 66. № 12. P. 2621–2625.
33. Wang Y., Yap L.L., Chua K.L., Khoo H.E. // *Toxicol.* 2008. V. 51. № 8. P. 1374–1382.
34. Anderluh G., Križaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P., Pungerčar J. // *Toxicol.* 1999. V. 37. № 10. P. 1391–1401.
35. Blumenthal K.M., Kem W.R. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 9. P. 5574–5581.
36. Kristan K., Podlesek Z., Hojnik V., Gutierrez-Aguirre I., Gunčar G., Turk D., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H., Maček P., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 45. P. 46509–46517.
37. Anderluh G., Barlič A., Potrich C., Macek P., Menestrina G. // *J. Membrane Biol.* 2000. V. 173. № 1. P. 47–55.
38. Mechaly A.E., Bellomio A., Gil-Cartón D., Morante K., Valle M., González-Mañas J.M., Guérin D.M. // *Structure.* 2011. V. 19. № 2. P. 181–191.
39. Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A.F.-P., Gilbert R.J.C., Macek P., Lakey J.H., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 283. № 27. P. 18665–18677.
40. Rojko N., Kristan K.C., Viero G., Zerovnik E., Maček P., Dalla Serra M., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 33. P. 23704–23715.
41. Zorec R., Tester M., Maček P., Mason W.T. // *J. Membrane Biol.* 1990. V. 118. № 3. P. 243–249.
42. Meunier F.A., Frangez R., Benoit E., Ouanounou G., Rouzair-Dubois B., Suput D., Molgo J. // *Toxicol.* 2000. V. 38. № 11. P. 1547–1560.
43. Lewis R.J., Garcia M.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. № 10. P. 790–802.
44. Takagi J. // *Biochem. Soc. Transactions.* 2004. V. 32. № 3. P. 403–406.

УДК 577.112, 577.181

Аципенсины – новые антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*

О. В. Шамова^{1,3}, Д. С. Орлов^{1,3}, С. В. Баландин^{2,4}, Е. И. Шрамова², Е. В. Цветкова³,
П. В. Пантелеев², Ю. Ф. Леонова², А. А. Тагаев², В. Н. Кокряков^{1,3}, Т. В. Овчинникова^{2,4*}

¹НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7–9

⁴Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700,
Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 11.10.2014

РЕФЕРАТ Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшими компонентами системы врожденного иммунитета человека и животных. Охарактеризован ряд АМП, выделенных нами из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* – представителя подкласса хрящевых ганоидов, формирующих наиболее древнюю группу костных рыб. Структурный анализ пептидов, названных аципенсинами (Ас), показал, что лейкоциты осетра содержат шесть пептидов с молекулярными массами 5336.2, 3803.0, 5173.0, 4777.5 и 5449.4 и 2740.2 Да, обозначенных Ас1–Ас6 соответственно. Нами определены полные первичные структуры всех выделенных пептидов и исследована биологическая активность трех главных компонентов – Ас1, Ас2 и Ас6. Установлено, что Ас1, Ас2, Ас3, Ас4 и Ас5 представляют собой N-концевые ацетилированные фрагменты 1–50, 1–35, 1–49, 1–44 и 1–51 гистона H2A соответственно, а Ас6 является фрагментом 62–85 гистона H2A. Выделенные из лейкоцитов пептиды Ас1 и Ас2 обладают высокой антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (*Escherichia coli* ML-35p, *Listeria monocytogenes* EGD, MRSA ATCC 33591), а также гриба *Candida albicans* 820. Ас6 активен только в отношении грамотрицательной бактерии. Активность Ас1 и Ас2 в отношении гриба и MRSA снижалась при повышении ионной силы раствора. В концентрациях, близких к минимальным ингибирующим, Ас1, Ас2 и Ас6 увеличивали проницаемость наружной мембраны *E. coli* ML-35p для хромогенного маркера, но их влияние на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии не было существенным по сравнению с действием мембраноактивного пептида протегрина 1. Все три аципенсина не проявляли гемолитической активности в отношении эритроцитов человека в диапазоне концентраций от 1 до 40 мкМ и не оказывали цитотоксических эффектов на клетки K-562 и U-937 (1–20 мкМ) *in vitro*. Обнаружение в лейкоцитах осетра антимикробных пептидов, производных гистона H2A, свидетельствует в пользу предположения о биологически значимой роли гистонов и их фрагментов в обеспечении противоинойфекционной защиты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, аципенсины, врожденный иммунитет, лейкоциты осетра, производные гистона H2A.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; ЗФР – забуференный физиологический раствор; КОЕ – колониеобразующие единицы; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТГС – триптический гидролизат сои; трис – трис(гидроксиметил)аминометан; ТФУ – трифторуксусная кислота; EDTA – этилендиаминтетраацетат натрия; ЭФ – электрофорез; Ас – аципенсин; HNP (human neutrophil peptide) – пептид нейтрофилов человека (α-дефенсин); MALDI-TOF-MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбционной ионизацией; MRSA – метициллинустойчивый золотистый стафилококк; ONPG – о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид; PG-1 – протегрин 1; SDS – додецилсульфат натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета играют важную роль в противомикробной защите человека и животных [1]. Особое место эти молекулярные факторы врожденного иммунитета занимают в обеспечении защитных функций у низших позвоночных (рыб, амфибий), так как система адаптивного иммунитета у пойкилотермных животных не может обеспечить формирование достаточно быстрого и эффективного ответа (антителообразование) на инфекцию при низкой температуре окружающей среды. Поэтому изучение антимикробных пептидов фагоцитов и слизистых покровов рыб представляется важным в связи с обоснованием биологической роли этой группы физиологически активных веществ в противомикробном иммунитете.

К настоящему времени описаны АМП (дефензины, кателицидины и др.) фагоцитов и барьерного эпителия различных представителей млекопитающих, птиц и амфибий. Сведения об АМП рыб пока весьма немногочисленны и в основном связаны с изучением этих соединений, выделенных из слизи, кожи, жабр, почек, селезенки и желудочно-кишечного тракта [2]. Так, из слизи камбалы *Pleuronectes americanus* были выделены плеуроцидины [3, 4] – группа линейных антимикробных пептидов, имеющих конформацию α -спирали и положительный заряд молекулы. Из слизистых покровов камбалы другого вида – *Pardachirus marmoratus* – был получен пептид, названный пардаксином [5]. Из жабр гибрида полосатого окуня выделен пептид хепцидин, содержащий четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика [6]. Позднее хепцидины были обнаружены и у других рыб. Из слизи кожных покровов амурского вьюна *Misgurnus anguillicaudatus* [7] был получен антимикробный пептид мисгурин, обладающий микробицидной активностью широкого спектра действия.

Пептиды семейства α -дефенсинов у рыб пока не обнаружены. Однако в последнее время появляются данные о β -дефенсинах костистых рыб: подобные пептиды найдены в эпителиальных клетках пищеварительного тракта, жабрах, селезенке китайского окуня *Siniperca chuatsi* [8], печени оранжевопятнистого групера *Epinephelus coioides* [9], в коже и жабрах карпа *Cyprinus carpio* L. [10]. Пептиды кателицидинового семейства обнаружены у радужной форели и других представителей лососевых, трески [11–15].

В коже и слизистых некоторых рыб выявлены пептиды, представляющие собой производные гистонов. Так, из слизистых покровов белокорого палтуса (*Hippoglossus hippoglossus* L.) и амурского сома *Parasilurus asotus* выделены антимикробные пепти-

ды, названные хиппосином [16] и паразинном 1 [17] соответственно, которые являются N-концевыми частями гистона H2A. Из печени семги *Salmo salar* был выделен антимикробный белок (SAM) с молекулярной массой 20734 Да, оказавшийся гистонем H1 [18].

Таким образом, к настоящему времени описан ряд антимикробных пептидов, выделенных из слизистых, кожи, пищеварительного тракта, жабр, селезенки и печени рыб. Однако практически отсутствуют данные об АМП из лейкоцитов крови рыб. Поэтому цель нашей работы состояла в изучении структурных свойств и биологической активности антимикробных пептидов из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* – представителя подкласса хрящевых ганоидов (Chondrostei), древнейшей группы костных рыб (Osteichthyes).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленабис-акриламид (Sigma, США), мочевины, хлорид натрия, трис(гидроксиметил)аминометан, МТТ (3-[4,5-диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид), агарозу, триптический гидролизат сои, трифторуксусную и гептафтормасляную кислоты, о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид фирмы Sigma (США); уксусную кислоту фирмы «Вектон» (Россия); среды и сыворотки для культур клеток фирмы «Биолот» (Россия); среду Сабуро НИЦФ (Россия); ферменты и буферы для ПЦР и геномной инженерии производства Thermo Fisher Scientific (США). В качестве стандартов были использованы антимикробные пептиды: химически синтезированный протегрин 1, любезно предоставленный профессором Робертом Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США), дефенсин человека HNP-1 и бактенецин 5, выделенные нами из лейкоцитов крови человека и козы соответственно, с использованием методики, описанной ранее [19].

Выделение и очистка антимикробных пептидов из лейкоцитов русского осетра

Кровь осетров *A. gueldenstaedtii*, отловленных в дельте Волги (Александровский осетровый завод), стабилизировали гепарином и оставляли на 6 ч в сосудах для расслаивания, после чего лейкоцитарную пленку (buffy coat) отбирали пипеткой и промывали дважды физиологическим раствором с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 400 g. Полученный осадок гомогенизировали. Экстракцию белков из лейкоцитарной массы проводили в 20% уксусной кислоте в течение 20 ч при 4°C при перемешивании на магнитной мешалке. Затем

гомогенат центрифугировали при 15000 *g* в течение 1 ч. Супернатант отбирали и подвергали ультрафильтрации через мембрану YM-10 на установке фирмы Amicon (США). Полученный материал, содержащий пептиды и низкомолекулярные белки с молекулярными массами менее 10–12 кДа, концентрировали с помощью ультрафильтрации через мембрану YM-0.5 до 1 мл и наносили на электрофоретическую колонку (предварительно добавив в пробу мочевины до концентрации 3 М) для разделения белков с помощью препаративного электрофореза (ЭФ). Препаративный ЭФ при непрерывной элюции белков проводили в 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой буферной системе в присутствии мочевины [20] в аппарате фирмы Bio-Rad (США). Элюированные с колонки белковые фракции анализировали с помощью аналитического ЭФ в присутствии додецилсульфата натрия [21], который проводили в пластинах ПААГ на приборе фирмы Hoeffer (США). Измеряли оптическую плотность раствора в каждой фракции при длине волны 280 нм, определяли антимикробную активность. Фракции, обладающие антимикробной активностью, отбирали и разделяли содержащиеся в них пептиды с помощью нескольких последовательных циклов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на установке Gold System фирмы Beckman (США) с использованием колонок Vydac C-18 (4.6 × 250 мм; 10 × 250 мм; диаметр частиц сорбента 5 мкм), элюируя пептиды в градиенте концентраций ацетонитрила с использованием различных противоионов (0.1% трифторуксусная кислота или 0.13% гептафтормасляная кислота). Полученные после проведения ОФ ВЭЖХ фракции высушивали с помощью центрифугирования под вакуумом на установке SpeedVac (Savant, США). Оценку чистоты проводили с помощью аналитического ЭФ, масс-спектрометрии MALDI-TOF, а также аналитической ОФ ВЭЖХ. Концентрацию белка в экстрактах из лейкоцитов осетров и в очищенных пептидных препаратах определяли по методу Брэдфорд, а также по методу Вольфа с использованием следующей формулы: концентрация пептида (мкг/мл) = $(A_{215} - A_{225}) \times 144$ [22].

Оценка антимикробной активности пептидов методом радиальной диффузии в агарозных гелях

Антибиотическое действие пептидов, выделенных из лейкоцитов, определяли по методу, предложенному Лерером и соавт. [23]. Определяли антимикробную активность препаратов в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также одного из грибов. Использовали следующие штаммы бактерий: грамотрицательная бактерия *Escherichia*

coli ML-35p, грамположительные бактерии: *Listeria monocytogenes* EGD, MRSA ATCC 33591 (золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину), гриб *Candida albicans* 820. Бактерии выращивали на твердой среде, содержащей 3% триптический гидролизат сои (Sigma, США); грибы – на среде, содержащей 3% Сабуро. При культивировании *E. coli* ML-35p в среду добавляли 100 мкг/мл ампициллина, а MRSA ATCC 33591 – 6 мкг/мл оксациллина. Штаммы микроорганизмов были любезно предоставлены профессором Робертом Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США).

Микроорганизмы культивировали в течение 16–18 ч в среде, содержащей 3% раствор триптического гидролизата сои (ТГС) при 37°C. Из полученной культуры отбирали аликвоты суспензии бактерий, переносили в свежеприготовленные 3% растворы ТГС и инкубировали при 37°C в течение 2.5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в логарифмической фазе роста. В экспериментах с грибом *C. albicans* использовали ночную культуру. Суспензии микроорганизмов далее центрифугировали при 400 *g* в течение 10 мин, осадок дважды промывали в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4 (НФБ), и ресуспендировали в 3 мл того же буфера. Для приготовления агарозных гелей, содержащих микроорганизмы, рассчитывали объем суспензии, в котором имеется 4×10^6 клеток [23]. Количество бактериальных клеток оценивали, измеряя оптическую плотность суспензий при длине волны 620 нм (принимали, что величина оптической плотности 0.2 соответствует 5×10^7 КОЕ/мл). Для грибов использовали другую формулу: величина оптической плотности при длине волны 450 нм, равная 1, соответствует 2.86×10^7 КОЕ/мл [23]. Рассчитанное количество суспензии микроорганизмов добавляли к 8 мл стерильного 1% раствора агарозы в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4 (в ряде экспериментов добавляли 100 мМ NaCl), при температуре 43°C. Полученную смесь выливали в стерильную пластиковую чашку Петри диаметром 90 мм, где смесь застывала с образованием агарозного геля. В агарозных гелях прокалывали отверстия диаметром 2 мм. В лунки вносили анализируемые образцы – серийные (двукратные) разведения пептидов в 0.01% водном растворе уксусной кислоты (контроль – 0.01% уксусная кислота без пептидов), и инкубировали в течение 3 ч при 37°C. За время инкубации пептиды диффундировали из лунок в агарозные гели. По окончании инкубации на поверхность агарозного геля наносили 1% раствор агарозы, содержащий 6% триптический гидролизат сои. Затем чашки инкубировали еще в течение 20 ч при 37°C. Для количественной оценки антибиотического действия пептидов измеряли диаметр зоны

ингибирования роста микробов вокруг лунок, принимая за 1 единицу 0.1 мм, и вычитали из измеренного значения 20 единиц, соответствующих диаметру лунки. Для каждого пептида определяли минимальную концентрацию, ингибирующую рост микробов (МИК), для чего строили графики зависимости антимикробной активности пептидов от их концентрации. За МИК принимали значение, полученное для точки пересечения графика линейной регрессии каждого пептида с осью абсцисс (концентрация пептидов в мкМ). В каждом эксперименте использовали по две параллельных пробы. Эксперименты повторяли 3 раза, рассчитывали среднее арифметическое полученных величин МИК \pm среднее квадратичное отклонение.

Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML-35p

Используемый в данном методе штамм *E. coli* ML-35p отличается отсутствием пермеазы лактозы (фермента, осуществляющего транспорт лактозы в клетку), причем синтез β -галактозидазы в цитоплазме этой бактерии не индуцибельный, как у большинства бактерий, а конститутивный. Кроме того, в периплазматическом пространстве *E. coli* ML-35p присутствует фермент β -лактамаза [24]. О состоянии цитоплазматической и наружной мембран *E. coli* ML-35p судили по ее проницаемости для хромогенных маркеров – *o*-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозида (ONPG) и нитроцефина – субстратов β -галактозидазы и β -лактамазы соответственно. Описанную ранее методику использовали в модификации [25]. При наличии в среде, окружающей бактерию, субстратов β -галактозидазы или β -лактамазы ферментативная реакция с участием этих субстратов может происходить только в том случае, если они способны проникать через бактериальные мембраны. Если под действием какого-либо повреждающего агента, например антимикуробного пептида, наружная и цитоплазматическая мембраны бактерии становятся проницаемыми для субстратов, то хромогенные продукты их гидролиза внутриклеточными ферментами выходят в инкубационную среду. Оптическая плотность среды при длине волны 496 или 420 нм (максимум поглощения хромогенных продуктов гидролиза нитроцефина или ONPG соответственно) увеличивается, что позволяет наблюдать за процессом повреждения наружной и цитоплазматической мембран бактерии под действием антимикуробного агента в режиме реального времени. Состав проб (100 мкл): 2.5 мМ ONPG или 20 мкМ нитроцефина; 2.5×10^7 КОЕ/мл бактерии; 0.01 М Na-фосфатный буфер pH 7.4; 0.03% ТГС; пептиды в concentra-

ции, равной их минимальной ингибирующей концентрации в данных условиях и измеренной с помощью стандартного метода подсчета колоний. Контрольные пробы содержали вместо препаратов равные объемы растворителя (0.01% уксусная кислота). Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность раствора при 496 и 420 нм с помощью спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при температуре 37°C и периодическом встряхивании планшетов в течение 2 ч. Данные обрабатывали в программе Sigma Plot 11. На графиках представлены результаты типичного эксперимента, каждая точка является средним арифметическим из двух значений, полученных для параллельных проб. Эксперименты повторяли 3 раза, характер кривых был аналогичным во всех трех сериях.

Анализ гемолитической активности пептидов

Кровь здоровых доноров собирали в пластиковые пробирки, используя гепарин в качестве антикоагулянта, центрифугировали в течение 10 мин при 250 *g* с охлаждением до 4°C. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 10 мл охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР) pH 7.4 с 4 мМ EDTA и центрифугировали в течение 10 мин при 250 *g* с охлаждением 4°C. Осадок промывали ЗФР 3 раза, проводя центрифугирование, как описано выше. Из осадка эритроцитов (условно принималось, что в осадке 100% содержание эритроцитов) отбирали 280 мкл, доводили объем суспензии до 10 мл охлажденным ЗФР, получая 2.8% суспензию. В анализируемые пробы вносили 27 мкл суспензии эритроцитов и 3 мкл исследуемого пептида в ЗФР в разных концентрациях. Для получения положительного контроля (100% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл детергента (10% раствор Тритон X-100). Для получения негативного контроля (0% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл ЗФР. Пробы в трех параллелях инкубировали при 37°C в течение 30 мин, реакцию останавливали добавлением 75 мкл охлажденного ЗФР. Пробы центрифугировали при 5000 *g* при 4°C в течение 4 мин, супернатант отбирали и вносили в ячейки 96-луночного планшета (Corning, США). Оптическую плотность проб при длине волны 540 нм измеряли на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Показатели гемолиза эритроцитов рассчитывали в процентах по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{\text{OD}_{540}(\text{образца}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})}{\text{OD}_{540}(100\% \text{ лизис}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})} \times 100\%.$$

МТТ-тест

Влияние пептидов на жизнеспособность клеток исследовали с помощью МТТ-теста [26]. Этот тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид – МТТ-реагента или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид – до голубого кристаллического формазана. В экспериментах использовали культивируемые клетки линий К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека) и U-937 (клетки гистиоцитарной лимфомы человека). Клеточные суспензии вносили в лунки 96-луночных планшетов (Orange Scientific, Бельгия) в среде RPMI 1640, по 20000 клеток на лунку, к клеткам добавляли по 10 мкл раствора пептида (в среде RPMI 1640) различной концентрации в четырех параллелях. В контрольные пробы вместо пептидов добавляли по 10 мкл среды. Планшеты далее помещали в CO₂-инкубатор на 20 ч. За 3 ч до окончания срока инкубации в лунки планшетов добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в ЗФР). По окончании инкубации в лунки вносили по 100 мкл изопропанола с 0.04 М HCl, перемешивали и измеряли оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 540 нм (вычитая величину оптической плотности при 690 нм как фоновую) на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Во всех расчетах за достоверный принимали 95% уровень значимости ($P < 0.05$).

Масс-спектрометрия

Молекулярные массы выделенных пептидов определяли на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Reflect III (Bruker, Германия), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma, Германия) в 20% ацетонитриле, 0.1% ТФУ в концентрации 10 мг/мл.

Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems, США). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков идентифицировали на анализаторе 120A PTH (Applied Biosystems, США).

Деблокирование N-концевых аминокислотных остатков

Ацетильную группу N-концевого остатка ацетилсерина удаляли по методике [27] на инертном носителе

ле иммобилоне, используемом при автоматическом секвенировании белка. Образец пептида наносили на иммобилон, помещали в пробирку объемом 500 мкл, смачивали 30 мкл 25% раствора ТФУ и затем инкубировали в закрытой пробирке в течение 4 мин при 45°C. Иммобилон с нанесенным на него пептидом подсушивали в открытой пробирке в течение 5 мин при 20°C и еще 10 мин при 45°C, а затем термостатировали в герметично закрытой пробирке в течение 72 ч при 45°C. Полученный образец использовали для автоматического секвенирования пептида.

Выделение геномной ДНК

Фрагменты тканей осетра инкубировали в буфере TNES (10 mM Трис-HCl, pH 7.5; 400 mM NaCl; 100 mM EDTA, 0.6% SDS) с 10 мг/мл протеиназы К в течение 16 ч при 55°C. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин к супернатанту добавляли 0.25 объема 5 M NaCl и осаждали ДНК добавлением одного объема 95% этанола. Осадок промывали 80% этанолом, подсушивали в открытой пробирке и растворяли в воде. Затем проводили однократную очистку ДНК смесью фенол : хлороформ (1 : 1, v/v), экстрагировали остатки фенола равным объемом хлороформа и осаждали ДНК 95% этанолом.

Аmplификация нуклеотидных последовательностей

Для амплификации внутренней области гена гистона H2A осетра использовали вырожденные праймеры № 1 (ATGTGTGGACG(A,C)GG(C,T)-AA(A,G)AC(A,C,T)GG) и № 2 (GTCTTCTTGGG(C,G)-AG(C,T)AG(C,T)AC(G,T)GCC). ПЦР проводили со ступенчатым понижением температуры на стадии отжига праймера (step-down): 94°C – 1 мин; 5 × (94°C – 30 с, 61°C – 40 с, 68°C – 60 с); 5 × (94°C – 30 с, 58°C – 40 с, 68°C – 60 с); 30 × (94°C – 30 с, 55°C – 40 с, 68°C – 60 с).

Геномную ДНК осетра перед постановкой инвертированной ПЦР обрабатывали рестриктазой BglII. Состав реакционной смеси: 1× буфер O (Thermo Fisher Scientific), 50 нг/мкл ДНК, 40 ед. BglII (Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили при 37°C в течение 16 ч в объеме 50 мкл. Продукты реакции разбавляли водой в 25 раз (2 нг/мкл ДНК), после чего проводили реакцию лигирования в течение 16 ч при 4°C в присутствии 10 mM АТФ. После этого осаждали ДНК 95% этанолом, осадок растворяли в воде и использовали в качестве матрицы для инвертированной ПЦР.

Инвертированную ПЦР проводили с помощью двух пар праймеров в два этапа. На первом этапе использовали праймеры № 3 (GAGCACAGCGGCCAGATAGA) и № 4

(СТГАААТСТТGGAGCTGGC) и следующую программу амплификации: 94°C – 5 мин; 35 × (94°C – 30 с, 58°C – 60 с, 72°C – 120 с). Полученный продукт разбавляли водой (1 : 100) и использовали в качестве матрицы для гнездовой ПЦР с праймерами № 5 (CACGCTGGGCATAGTTTCC) и № 6 (GAATCATCCCGCGTCACTG) в следующих условиях: 94°C – 5 мин; 35 × (94°C – 30 с, 62°C – 60 с, 72°C – 120 с).

Клонирование и секвенирование продуктов ПЦР

Продукты ПЦР элюировали из легкоплавкой агарозы и лигировали по липким Т/А-концам с pGEM-T-вектором (Promega, США). Работы с рекомбинантной ДНК проводили согласно базовым методикам [28]. Для трансформации использовали компетентные клетки штамма *E. coli* DH-10B (Life Technologies, США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса. ДНК секвенировали с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистическая обработка результатов

Данные, полученные в ходе изучения антимикробной активности пептидов, представлены как среднее арифметическое ± среднееквадратичное отклонение. Среднее арифметическое получали из данных трех независимых экспериментов, в каждом из которых использовали по две параллельные пробы. Обработку данных проводили в программе Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структурная характеристика АМП из лейкоцитов русского осетра

Для получения антимикробных пептидов из лейкоцитов крови русского осетра использовали процедуру выделения и очистки, включающую кислотную экстракцию белков и пептидов из лейкоцитарной массы, ультрафильтрацию, препаративный ЭФ и обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию [29]. Применение этого комплекса методов позволило получить шесть очищенных АМП, имеющих молекулярные массы 5448.8, 5336.0, 5174.0, 4777.6, 3804.0 и 2741.7 Да, определенные с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, причем три пептида с молекулярными массами 5336.0, 3804.0 и 2741.7 Да составляли преобладающие пептидные фракции. Описанную выше процедуру выделения повторяли несколько раз с использованием лейкоцитов крови осетров разного пола и возраста, отловленных в разное время, причем в каждом цикле вы-

деления получали сходный спектр антимикробных пептидов. В ряде экспериментов в ходе получения лейкоцитарной массы и проведения экстракции применяли ингибитор сериновых протеаз фенолметилсульфонилфторид, что не приводило к заметному изменению спектра антимикробных пептидов. В задачи данной работы входила структурная характеристика выделенных пептидов и изучение их биологической активности.

Частичная N-концевая аминокислотная последовательность пептидов была установлена методом автоматического микросеквенирования. В ряде случаев секвенирование стало возможным после проведения химической реакции деблокирования N-концевых аминокислотных остатков. Удаление ацетильной группы N-концевого остатка ацетилсерина проводили в кислой среде с использованием 25% раствора ТФУ. После снятия ацетильной защиты N-концевая аминогруппа легко подвергалась модификации фенилизотиоцианатом, что позволило осуществить ступенчатую деградацию пептидов по методу Эдмана с помощью системы секвенирования белков Procise cLC 491 и идентифицировать фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков.

Анализ N-концевых последовательностей пептидов русского осетра *A. gueldenstaedtii*, которые мы назвали аципенсинами 1–5, с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показал, что они представляют собой N-концевые фрагменты гистона семейства H2A, в то время как еще один пептид, аципенсин 6, является фрагментом центральной части молекулы гистона этого же семейства. Эти АМП составляют основную часть кислоторастворимых пептидов лейкоцитов осетра, обладающих антимикробной активностью.

Для установления полной первичной структуры аципенсинов было проведено клонирование и секвенирование кодирующих их нуклеотидных последовательностей. Известно, что в генах канонических гистонов, наиболее широко представленных в клетках эукариот, отсутствуют интроны, а их мРНК лишены 3'-концевой полиА-последовательности [30]. Полиаденилированию подвергаются лишь мРНК специализированных вариантов гистонов, составляющих минорную фракцию этих белков. Еще одна особенность канонических гистонов – наличие в геноме нескольких копий их генов. Все это делает предпочтительным использование геномной ДНК в качестве матрицы для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих гистоны. Предположив, что выделенные нами АМП представляют собой продукты частичного протеолиза преобладающей фракции гистона H2A осетра, мы решили амплифицировать участок геномной

Антимикробная активность аципенсинов Ac1, Ac2 и Ac6*

Пептид	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ							
	<i>E. coli</i> ML-35p		<i>Listeria monocytogenes</i> EGD		MRSA ATCC 33591		<i>Candida albicans</i> 820	
	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl
Ac1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	2.3 ± 0.4	0.9 ± 0.2	> 40	1 ± 0.2	> 40
Ac2	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1	> 40	0.9 ± 0.1	> 40
Ac6	2.5 ± 0.3	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
HNP-1	0.8 ± 0.1	> 50	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.3	> 50	2.1 ± 0.4	> 50
PG-1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.4
ChVac5	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.7	0.8 ± 0.3	>40	0.9 ± 0.2	> 40

*Пептиды инкубировали с микроорганизмами в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4 и в этом буфере, содержащем 100 мМ NaCl. Пептидами сравнения были протегрин 1 (PG-1) свиньи, α-дефенсин человека HNP-1, бактенецин козы ChVac5.

togenes EGD; устойчивого к метициллину *S. aureus* (MRSA) ATCC 33591 и гриба *C. albicans* 820 приведены в таблице. Сравнили активность аципенсинов и трех других АМП, имеющих различную структуру и механизм антимикробного действия: протегрина 1 свиньи, α-дефенсина человека HNP-1 и бактенецина козы ChVac5. α-дефенсины – основные представители антимикробных пептидов, наряду с кателицидином LL-37 нейтрофильных гранулоцитов человека. Обогащенные пролином бактенецины – преобладающее семейство АМП нейтрофилов коз и овец. Протегрин 1 (PG-1) лейкоцитов свиньи имеет конформацию β-шпильки и относится к наиболее активным из описанных к настоящему времени пептидов лейкоцитов животных, обладающих широким спектром антимикробного действия, основанного на его способности повреждать мембраны микроорганизмов.

Из таблицы видно, что в среде с низкой ионной силой аципенсины 1 и 2 имеют широкий спектр действия и проявляют высокую антимикробную активность как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также гриба. Однако при повышении ионной силы среды спектр активности Ac1 и Ac2 меняется: эффективность их действия в отношении грамположительной бактерии MRSA ATCC 33591 и *C. albicans* 820 существенно снижается. Ac6 проявляет антимикробный эффект лишь в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* в среде с низкой ионной силой. Характер анти-

микробного действия Ac1 и Ac2 отличен от действия мембраноактивного PG-1 и сходен с эффектами бактенецина ChVac5. Известно, что бактенецины проявляют антибактериальное действие преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий, причем эти пептиды не повреждают существенно бактериальные мембраны и воздействуют на внутриклеточные мишени [14]. Хотя аципенсины не имеют структурного сходства с пролин-богатыми бактенецинами, можно предположить, что основной мишенью их антибактериального действия не являются бактериальные мембраны. Изучение эффектов Ac1, Ac2, Ac6 на барьерную функцию бактериальных мембран было следующей задачей работы.

Влияние аципенсинов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML-35p для хромогенных маркеров

На рис. 2 представлена кинетика действия аципенсинов 1, 2 и 6 (в концентрации, равной их минимальной ингибирующей концентрации в отношении этой бактерии) на наружную и внутреннюю (цитоплазматическую) мембраны *E. coli* ML-35p. Мембраноактивный пептид PG-1 использовали в качестве стандарта. Аципенсины 1 и 2 оказывают выраженное действие на проницаемость наружной мембраны бактерии для хромогенного маркера нитроцефина (о чем свидетельствует возрастание оптической плотности раствора, определяемое по появлению цветного продукта расщепления нитроцефина

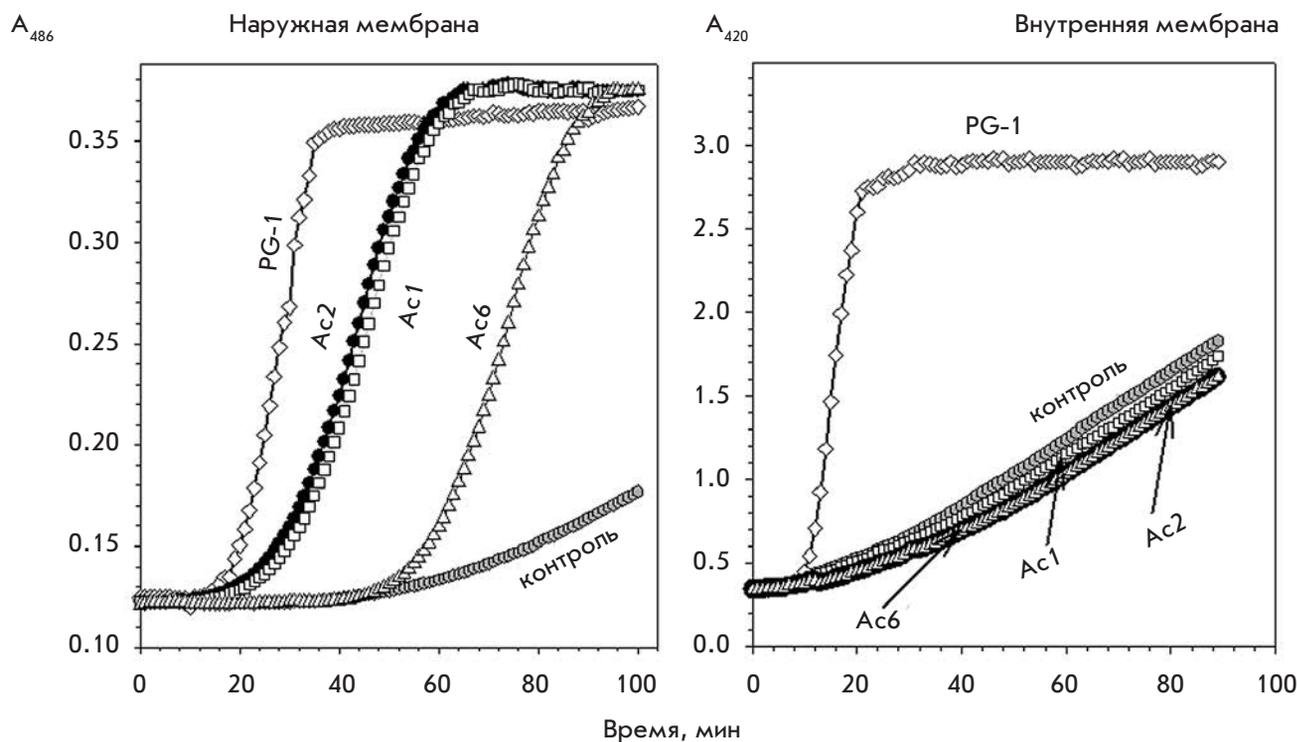


Рис. 2. Кинетика изменения проницаемости мембран *E. coli* ML-35r для хромогенных маркеров при действии antimicrobных пептидов. По оси ординат отложена оптическая плотность раствора, содержащего хромогенные маркеры (продукт гидролиза нитроцефина в случае наружной мембраны и продукт гидролиза ONPG (о-нитрофенол) в случае внутренней мембраны), по оси абсцисс – время инкубации пептидов с бактерией в минутах. Пептид сравнения – протегрин 1 (PG-1). Контролем служили пробы, содержащие бактерию в отсутствие пептидов

(см. «Экспериментальную часть»)), хотя и в несколько меньшей степени, чем PG-1. Увеличение проницаемости наружной мембраны наблюдалось через 15–29 мин после добавления Ac1 и Ac2 к бактериям и через 50 мин в случае Ac6. Однако через 90 мин после начала эксперимента действие всех трех аципенсинов на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML-35r, оцениваемое данным методом, практически отсутствовало: проницаемость мембраны для хромогенного маркера ONPG не изменялась по сравнению с контрольными значениями (показатели в пробах, не содержащих пептиды). Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что основной мишенью действия аципенсинов и бактенецинов в концентрациях, близких к МИК, являются не бактериальные мембраны, а внутриклеточные компоненты. Известно, что кроме antimicrobной активности большинство АМП вызывают разнообразные эффекты в собственных клетках организма, в том числе и клеточную гибель, обусловленную цитотоксическим действием. Нами изучена возможность проявления аципенсинами токсического действия на клетки макроорганизма.

Цитотоксическая активность аципенсинов в отношении клеток человека *in vitro*

Как и в большей части публикаций, посвященных цитотоксической активности различных АМП, основной интерес вызывает активность этого типа пептидов в отношении клеток человека, поскольку природные АМП рассматриваются как перспективные прототипы новых лекарственных препаратов. Поэтому выяснение того, насколько токсичны данные соединения именно для клеток человека, представляется исключительно важным. Нами определена гемолитическая активность аципенсинов 1, 2 и 6 в отношении эритроцитов человека. Установлено, что в диапазоне концентраций 1–40 мкМ исследуемые пептиды не вызывают гемолиз эритроцитов (рис. 3). Как и в предыдущих экспериментах, в качестве положительного контроля использовали PG-1, обладающий высокой гемолитической активностью, в отличие от пептидов осетра. При изучении действия аципенсинов на культивируемые клетки человека линий К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека) и U-937 (клетки гистиоцитарной лимфомы человека) установлено, что в concentra-

ции 1–20 мкМ пептиды не оказывают токсических эффектов в отношении клеток-мишеней. После инкубации клеток с каждым из исследуемых аципенсинов в течение 20 ч доля жизнеспособных клеток была такой же, как в контрольных пробах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение у рыб и амфибий катионных пептидов, проявляющих антимикробную активность и представляющих собой фрагменты гистонов, позволило ряду ученых предположить, что эти производные гистонов могут иметь неядерную локализацию и выполнять функцию антимикробной защиты [18, 32, 33]. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные об обнаружении гистона Н1 в цитозоле ворсинок клеток кишечника человека [34]. У мышей Н1 выявлен на поверхности макрофагов, где служит рецептором тиреоглобулина [35]. Из гранулярной фракции макрофагов мыши были получены гистоны Н1 (MUMP-1 и -2) и Н2В (MUMP-3) [36]. Кроме того, гистон Н1 выявлен на поверхности нейронов мыши [37], моноцитов человека [38], неспецифических цитотоксических клеток канального сома (сходных с натуральными киллерными клетками млекопитающих) [39]. Важность роли гистонов в протекании иммунных процессов стала очевидной, когда появились сведения об их участии в функционировании нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs, Neutrophil extracellular traps) [40, 41]. Формирование данных структур, впервые идентифицированных в 2004 г., является третьим, наряду с фагоцитозом и секрецией антимикробных соединений, механизмом киллерной активности нейтрофилов [42]. Внеклеточные ловушки формируются в процессе «нетоза» (NETosis) – контролируемой клеточной гибели, существенно отличающейся от некроза и апоптоза, и представляют собой сеть из деконденсированного хроматина, которая включает антимикробные факторы как гранулярного (протеазы, АМП), так и ядерного (гистоны и продукты их частичного протеолиза) происхождения. Внеклеточные ловушки обеспечивают захват и уничтожение патогенных микроорганизмов, которые, по какой-либо причине, не могут быть обезврежены с помощью фагоцитоза. Благодаря структурирующей роли ДНК, диффузия антимикробных факторов из ловушки замедлена, что позволяет достичь высоких локальных концентраций этих веществ и снизить повреждающий эффект на здоровые ткани.

Полученные в настоящей работе сведения о структурных и функциональных свойствах антимикробных пептидов лейкоцитов русского осетра – аципенсинов, производных гистона Н2А, подтверждают гипотезу о том, что в процессе эволюции у отдель-

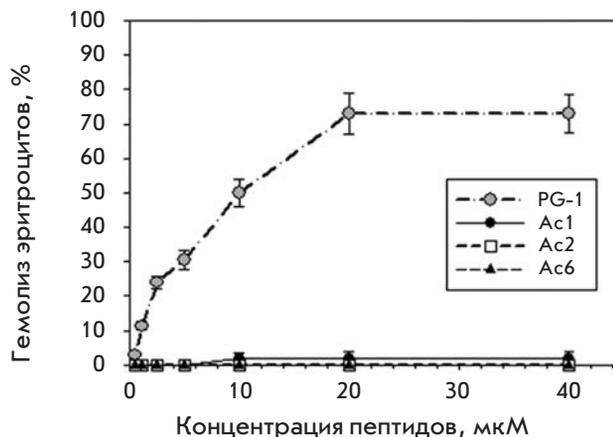


Рис. 3. Гемолитическая активность аципенсинов.

По оси ординат указана величина гемолиза эритроцитов в процентах (за 100% принимали величину, полученную при действии на эритроциты 1% раствора Триптона X-100), по оси абсцисс – концентрация пептидов в мкМ. Пептид сравнения – протегрин 1 (PG-1)

ных групп животных в качестве эндогенных антибиотических пептидов могли отобраться производные белков, обычно имеющих ядерную локализацию. Это свидетельствует об удивительном разнообразии структурных семейств АМП у представителей различных таксонов животного мира. Известно, что наиболее распространенная группа АМП – представители семейства дефенсинов, функциональная активность которых реализуется в фагоцитах (нейтрофилы и макрофаги позвоночных, амебоциты и целомоциты беспозвоночных) и на уровне барьерного эпителия внешних покровов и слизистых животных. Однако в лейкоцитах осетра мы не выявили пептиды дефенсинового семейства. Дефенсины отсутствуют и в фагоцитах некоторых видов млекопитающих (мышь, кошка, собака, овца, коза) – функцию молекул, инактивирующих фагоцитированные микробы, у этих видов выполняют пептиды кателицидинового семейства (бактенецины, протегрины и др.). Своеобразие видового паттерна антимикробных пептидов лейкоцитов русского осетра заключается в доминировании среди них производных гистона Н2А, которые не обнаруживали ранее в фагоцитах рыб.

Аципенсины обладают широким спектром антимикробного действия, как и другие известные в настоящее время производные гистона Н2А: буфорин, паразин, хиппосин, абхизин (пептид моллюска халиотиса) [16, 17, 31, 43]. В отличие от паразина и буфорина 1 у аципенсинов 1–5 ацетилован N-конец. Этим же свойством обладает молекула хиппосина [16]. Установлено, что ацетилирование N-конца

не требуется для проявления антимикробной активности, поскольку синтетический неацетилованный хиппосин оказался активным [16].

Наблюдаемое снижение антимикробной активности аципенсинов при повышении ионной силы раствора характерно для многих описанных АМП, например, α -дефенсинов человека, бактенецинов козы. Известно, что антимикробная активность дефенсинов может восстанавливаться в средах, содержащих физиологические концентрации хлорида натрия, в результате синергичного взаимодействия с другими АМП нейтрофилов человека, в частности, с кателицидином LL-37 [44]. Можно предположить, что наряду с конститутивно синтезируемыми аципенсинами в лейкоцитах осетра имеются индуцибельные антимикробные факторы, синтез которых при развитии инфекционного процесса усиливается. Эти факторы могут действовать совместно с аципенсинами, в результате чего повышается эффективность антимикробного действия АМП.

Данные о низкой по сравнению с Ас1 и Ас2 антимикробной активности Ас6 позволяют предположить, что именно N-концевые производные гистона H2A играют ключевую роль в осуществлении противоинойфекционной защиты.

Механизмы действия описанных в литературе АМП, производных гистона H2A, несколько различаются: основной механизм антимикробного действия буфорина 2 связывают с его способностью проникать в бактериальные клетки без существенного повреждения их мембран и взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, что приводит к угнетению жизненно важных процессов в микробных клетках и их гибели [45, 46]. Однако другой пептид – паразин – значительно повреждает бактериальные мембраны [47]. Показано, что синтетический аналог хиппосина тоже обладает способностью увеличивать проницаемость мембран бактерии (*E. coli* ATCC 25922) [48]. Хотя аципенсины имеют значительное структурное сходство с хиппосином, в наших экспериментах не наблюдалось заметного возрастания проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p при действии аципенсинов. С одной стороны, можно предположить, что разница в результатах связана с тем, что в нашей работе использовались другие штаммы бактерий и маркеры проницаемости. С другой стороны, возможно, решающую роль играет концентрация пептидов. Так, установлен двунаправленный механизм действия (Dual mode of action) обогащенных пролином пептидов, в частности, бактенецинов быка [49]: в концентрациях, близких к МИК, пептиды не оказывали повреждающего действия на мембраны, их эффекты были связаны с влиянием на внутриклеточные мишени, в то время как в кон-

центрациях, превышающих МИК, эти АМП нарушали структурную целостность мембран, в дополнение к ингибированию внутриклеточных процессов. Так как в экспериментах по оценке влияния аципенсинов на проницаемость бактериальных мембран использовали концентрации, близкие к МИК, можно предположить, что в более высоких концентрациях аципенсины, как бактенецины и хиппосин способны нарушать и барьерную функцию мембран бактерий. Наконец, нельзя исключать и того, что наблюдаемое расхождение в результатах может быть связано с теми немногочисленными аминокислотными заменами, которые отличают Ас1 и Ас2 от аналога хиппосина, используемого в работе [48]. Более детальное исследование действия аципенсинов на бактериальные мембраны будет проведено нами с применением рекомбинантных аналогов аципенсинов.

Как и другие природные АМП, производные гистона H2A, все три исследованных нами аципенсина – Ас1, Ас2 и Ас6 – не проявляли существенной цитотоксической активности в отношении культивируемых клеток человека. Дальнейшее изучение взаимодействия аципенсинов и их структурных аналогов позволит установить, обладают ли они, подобно буфоринам, способностью транслоцироваться через мембраны эукариотических клеток [46]. Наличие подобных свойств открывает перспективы практического применения пептидов в противоопухолевой терапии, в качестве векторов для доставки лекарственных препаратов в малигнизированные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые из лейкоцитов русского осетра *A. gueldenstaedtii* получен набор антимикробных пептидов, названных аципенсинами и представляющих собой фрагменты гистона H2A. Эти пептиды обладают широким спектром антимикробной активности, но не проявляют токсических свойств в отношении клеток макроорганизма. Полученные данные вносят вклад в развитие представлений об эволюции молекулярных факторов врожденного иммунитета, а также свидетельствуют в пользу предположения о биологической роли гистонов как защитных молекул, участвующих в реализации противоинойфекционной функции иммунной системы. ●

Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0104). Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0104.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
2. Rieger A.M., Barreda D.R. // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. V. 35. № 12. P. 1238–1245.
3. Cole A.M., Weis P., Diamond G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 18. P. 12008–12013.
4. Douglas S.E., Gallant J.W., Gong Z., Hew C. // *Dev. Comp. Immunol.* 2001. V. 25. № 2. P. 137–147.
5. Shai Y., Fox J., Caratsch C., Shih Y.L., Edwards C., Lazarovici P. // *FEBS Lett.* 1988. V. 242. P. 161–166.
6. 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. P. 2232–2237.
7. Park C., Lee J., Park I., Kim M., Kim S. // *FEBS Lett.* 1997. V. 411. № 2–3. P. 173–178.
8. Wang G., Li J., Zou P., Xie H., Huang B., Nie P., Chang M. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 33. № 3. P. 522–531.
9. Guo M., Wei J., Huang X., Huang Y., Qin Q. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 32. № 5. P. 828–838.
10. Marel Mv., Adamek M., Gonzalez S.F., Frost P., Rombout J.H., Wiegertjes G.F., Savelkoul H.F., Steinhagen D. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 32. № 3. P. 494–501.
11. Maier V.H., Dorn K.V., Gudmundsdottir B.K., Gudmundsson G.H. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. P. 3723–3730.
12. Chang C., Pleguezuelos O., Zhang Y., Zou J., Secombes C. // *Infection, Immunity.* 2005. V. 73. P. 5053–5064.
13. Chang C., Zhang Y., Zou J., Nie P., Secombes C. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006. V. 50. P. 185–195.
14. Scocchi M., Pallavicini A., Salgaro R., Bociek K., Gennaro R. // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2009. V. 152. № 4. P. 376–381.
15. Bridle A., Nosworthy E., Polinski M., Nowak B. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. e23417.
16. Birkemo G. A., Lüders T., Andersen Ø., Nes I.F., Nissen-Meyer J. Hippusin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1646. P. 207–215.
17. Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 258–262.
18. Richards R.C., O'Neil D.B., Thibault P., Ewart K.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 284. P. 549–555.
19. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., et al. // *Internat. J. Peptide Res. Therapeut.* 2009. V. 15. № 1. P. 31–35.
20. Harwig S.S., Chen N.P., Park A.S.K., Lehrer R.I. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 382–346.
21. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
22. Wolf P. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 129. № 1. P. 145–155.
23. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. V. 137. № 2. P. 167–173.
24. Lehrer R., Barton A., Ganz T. // *J. Immunol. Meth.* 1988. V. 108. P. 153–158.
25. Артамонов А.Ю., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Орлов Д.С. // *Вестн. Санкт-Петербургского университета.* 2008. Сер. 3. № 2. С. 139–142.
26. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55–63.
27. Wellner D., Panneerselvam C., Horecker B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 1947–1949.
28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manuals.* 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
29. Шамова О.В., Орлов Д.С., Овчинникова Т.В., Сал Х.Г., Тверьянович И.А., Попова В.А., Дюбин В.А., Кокряков В.Н. // *Фундаментальные исследования.* 2006. № 1. С. 10–13.
30. Marzluff W.F., Wagner E.J., Duronio R.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 11. P. 843–854.
31. Kim H.S., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 229. № 2. P. 381–387.
32. Kawasaki H., Iwamuro S. // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2008. V. 8. № 3. P. 195–205.
33. Parseghian M., Luhrs K. // *Biochem. Cell Biol.* 2006. V. 84. № 4. P. 589–604.
34. Rose F.R., Bailey K., Keyte J.W., Chan W.C., Greenwood D., Mahida Y.R. // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. P. 3255–3263.
35. Brix K., Summa W., Lottspeich F., Herzog V. // *J. Clin. Invest.* 1998. V. 102. P. 283–293.
36. Hiemstra P.S., Eisenhauer P.B., Harwig S.S., van den Barselaar M.T., van Furth R., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1993. V. 61. P. 3038–3046.
37. Bolton S.J., Perry V.H. // *J. Neurocytol.* 1997. V. 26. P. 823–831.
38. Holers V.M., Kotzin B.L. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 76. P. 991–998.
39. Evans D.L., Kaur H., Leary J. 3rd, Praveen K., Jaso-Friedmann L. // *Dev. Comp. Immunol.* 2005. V. 29. № 12. P. 1049–1064.
40. Nauseef W.M., Borregaard N. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 7. P. 602–611.
41. Zawrotniak M., Rapala-Kozik M. // *Acta Biochim. Pol.* 2013. V. 60. № 3. P. 277–284.
42. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. // *Science.* 2004. V. 303. № 5663. P. 1532–1535.
43. De Zoysa M., Nikapitiya C., Whang I., Lee J.S., Lee J. // *Fish Shellfish Immunol.* 2009. V. 27. № 5. P. 639–646.
44. Nagaoka I., Hirota S., Yomogida S., Ohwada A., Hirata M. // *Inflamm. Res.* 2000. V. 49. № 2. P. 73–79.
45. Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 1. P. 253–257.
46. Cho J.H., Sung B.H., Kim S.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. № 3. P. 1564–1569.
47. Koo Y.S., Kim J.M., Park I.Y., Yu B.J., Jang S.A., Kim K.S., Park C.B., Cho J.H., Kim S.C. // *Peptides.* 2008. V. 29. P. 1102–1108.
48. Bustillo M.E., Fischer A. L., LaBouyer M.A., Klaips J. A., Webb A.C., Elmore D.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1838. № 9. P. 2228–2233.
49. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1760. P. 1732–1740.

УДК 612.816

Механизм подавления холином выброса ацетилхолина в моторных синапсах мышцы

А. Е. Гайдуков*, П. О. Богачева, Е. О. Тарасова, О. П. Балежина

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2014

РЕФЕРАТ На нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышцы с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) исследовали механизм тонического действия холина – агониста никотиновых холинорецепторов (нХР) $\alpha 7$ -типа, на спонтанную и вызванную секрецию медиатора в моторных синапсах мышцы. Показано пресинаптическое тормозное влияние экзогенного холина на амплитуду и квантовый состав потенциалов концевой пластинки при одиночной и ритмической вызванной активности нервно-мышечных синапсов, которое предотвращалось блокаторами $\alpha 7$ -никотиновых холинорецепторов – метилликаконитином или α -кобратоксином, а также блокированием кальций-активируемых калиевых каналов SK-типа апамином или внутритерминальных рианодиновых рецепторов – рианодином. Высказано предположение, что в моторных нервных терминалях мышцы холин способен активировать пресинаптические $\alpha 7$ -никотиновые холинорецепторы с последующим выбросом депонированного кальция через рианодиновые рецепторы и активацией кальций-зависимых калиевых каналов SK-типа, что приводит к устойчивому снижению квантового состава вызванного выброса медиатора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА квантовый состав, рианодиновые рецепторы, холин, $\alpha 7$ -никотиновые холинорецепторы, SK-каналы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; МПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки; нХР – никотиновые холинорецепторы; ПКП – потенциалы концевой пластинки.

ВВЕДЕНИЕ

Свойства постсинаптических никотиновых холинорецепторов в моторных синапсах скелетной мускулатуры позвоночных хорошо изучены [1–3], тогда как данные о пресинаптических нХР у таких синапсов немногочисленны и противоречивы. Иммуногистохимические и фармакологические тесты свидетельствуют о наличии в моторных синапсах нескольких типов нейрональных пресинаптических нХР [4–7]. При этом малоизученным остается вопрос о локализации и функциях особого типа нХР – $\alpha 7$ -нХР [8, 9], которые характеризуются относительно высокой проводимостью для ионов кальция [10–12]. Если в центральной нервной системе активация пресинаптических $\alpha 7$ -нХР ацетилхолином (АХ) или избирательными агонистами (холином, никотином), как правило, способствует секреции медиатора [13–16], то в периферических моторных синапсах, напротив, наблюдается торможение секреции [5, 17]. В наших предыдущих исследованиях активация $\alpha 7$ -нХР низкими дозами никотина вызывала кальций-зависимое подавление вызванного выброса ацетил-

холина в ритмически активных нервно-мышечных синапсах мышцы, которое предотвращалось метилликаконитином – избирательным антагонистом $\alpha 7$ -нХР [18]. Механизмы этого торможения остаются не изученными. В связи с этим в представленной работе пресинаптические $\alpha 7$ -нХР активировали их избирательным агонистом – холином, чтобы проследить способность холина подавлять вызванный выброс АХ и изучить механизмы этого действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma – n. phrenicus*) взрослых (P30) самцов мышей 129/Sv, полученных из Института нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН (Москва). Всего использовали 27 животных, которых содержали в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Протокол был одобрен комиссией по биоэтике био-

логического факультета МГУ. Мышей умерщвляли посредством быстрого обезглавливания.

Электрофизиология

Процедуру рассечения мышечных волокон, позволяющую одновременно регистрировать спонтанный и нередуцированный вызванный выброс медиатора, проводили, используя стандартный протокол [5, 17, 18]. Левую половину диафрагмы с диафрагмальным нервом помещали в камеру объемом 3 мл и перфузировали при комнатной температуре оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли (рН 7.2–7.4), содержащим (мМ): NaCl – 135, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 0.9, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 16.3, глюкозу – 11. Все опыты проводили при температуре 20–22°C. Регистрацию МПКП и вызванных ПКП осуществляли с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М KCl (сопротивление кончика микроэлектрода составляло 15–20 МОм). Одиночные ПКП регистрировали при раздражении диафрагмального нерва сверхпороговыми импульсами с частотой 0.3 Гц (не менее 30 стимулов). При изучении ритмической активности синапсов диафрагмальный нерв стимулировали короткими пачками импульсов (50 стимулов длительностью 0.1 мс с частотой 50 Гц). Сигналы регистрировали при помощи усилителя Axoclamp-2B (Molecular Devices) и записывали их с помощью аналого-цифрового преобразователя L-Card E-154 с интерфейсом PowerGraph на жесткий диск компьютера. Полученные данные обрабатывали в программе MiniAnalysis (Synaptosoft). В контроле регистрировали МПКП и ПКП от пяти и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 1–1.5 ч. В каждой серии опытов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Вещества и растворы

В работе использовали холин, метилликаонитин, апамин (Sigma, США), рианодин (Enzo Life Sciences, США). Высокоаффинный блокатор α7-нХР – длинноцепочечный α-кобратоксин (из яда кобры *Naja naja kaouthia*) [19–21] – был любезно предоставлен Ю.Н. Уткиным, заведующим лабораторией молекулярной токсикологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва).

Анализ данных и статистика

Оценивали амплитуду, временной ход МПКП и ПКП, частоту МПКП и квантовый состав ПКП (его считывали как отношение средней скорректиро-

ванной на нелинейную сумму амплитуды ПКП [22] к средней амплитуде МПКП). Статистическую значимость различий между выборками оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (*n* – количество исследованных синапсов).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии экспериментов мышцу перфузировали раствором холина в концентрации 100 мкМ в течение 40 мин. Анализировали характеристики МПКП и одиночных вызванных ПКП. Не выявлено статистически значимых изменений мембранного потенциала покоя (МП) в области постсинаптической мембраны в течение 40 мин перфузии холином (среднее значение МП в контроле составило -39.16 ± 1.13 мВ (*n* = 18) и -40.06 ± 1.18 в присутствии холина (*n* = 19). Холин приводил к снижению амплитуды ПКП в среднем более чем на 25% по сравнению с контролем (рис. 1А). Эффект развивался на протяжении 10–15 мин от начала аппликации холина и оставался неизменным в течение последующих 30 мин. При этом амплитуда, временные характеристики и частота МПКП не изменялись статистически значимо, а снижение амплитуды ПКП происходило за счет уменьшения квантового состава ПКП – от 34.20 ± 2.56 в контроле до 25 ± 2.56 на фоне холина (*p* < 0.05) (рис. 1Б). В дополнительных экспериментах на интактных (нерассеченных) нервно-мышечных препаратах холин (100 мкМ) не вызывал значимых изменений амплитуды МПКП (1.49 ± 0.07 мВ в контроле (*n* = 17), под действием холина 1.52 ± 0.11 (*n* = 17, *p* < 0.05)). Частота и временной ход МПКП на фоне действия холина не отличались статистически значимо от контрольных значений. Таким образом, снижение квантового состава ПКП в присутствии холина при неизменных параметрах МП и МПКП свидетельствует о пресинаптическом тормозном действии холина на вызванную квантовую секрецию АХ.

Торможение холином квантового состава одиночных ПКП предотвращалось избирательным блокатором α7-нХР – метилликаонитином (20 нМ) (MLA). Сам MLA в течение 15–30 мин аппликации не вызывал статистически значимых изменений параметров МПКП и ПКП, однако холин в присутствии метилликаонитина не вызывал снижения амплитуды и квантового состав одиночных ПКП (рис. 1А,Б). Аналогичные результаты – предотвращение угнетающего действия экзогенного холина на квантовый состав одиночных ПКП – получены с использованием другого избирательного блокатора α7-нХР – длинноцепочечного α-кобратоксина (5 нМ) (СТх) (рис. 1Б). Это означает, что холин при его тонической аппли-

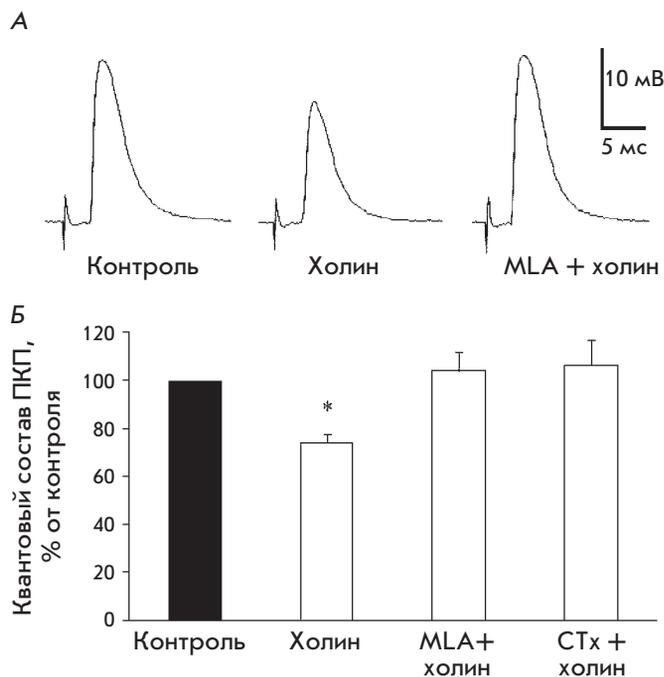


Рис. 1. Тормозное влияние экзогенного холина на одиночную (0.3 Гц) вызванную секрецию медиатора реализуется через его действие на $\alpha 7$ -нХР. А – усредненные записи одиночных ПКП в контроле, в присутствии холина (100 мкМ) и при действии холина (100 мкМ) на фоне блокатора $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ). Б – квантовый состав одиночных ПКП в контроле, в присутствии холина и под действием холина на фоне предварительно введенных блокаторов $\alpha 7$ -нХР – MLA и СТх (5 нМ). По оси ординат показан квантовый состав ПКП в % от контроля. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

кации обеспечивает подавление вызванного выброса АХ именно через активацию пресинаптических $\alpha 7$ -нХР.

В следующей серии экспериментов исследовали эффекты холина в отношении коротких залпов из 50 ПКП (50 Гц, 1 с). На фоне 40 мин аппликации холина (100 мкМ) наблюдали снижение амплитуды и квантового состава ПКП, такое же как у одиночных ПКП, которое проявлялось у первого и всех последующих ПКП в залпе. Эффект развивался на протяжении первых 10–15 мин аппликации холина и оставался неизменным в течение последующих 30 мин. При этом рисунок залпа ПКП не менялся: как и в контроле, в начале залпа наблюдается кратковременное облегчение синаптической передачи, которое сменяется депрессией с выходом на стабильный, сниженный по сравнению с первым ПКП, уровень ПКП в залпе («плато») (рис. 2А). Предварительная аппликация на нервно-мышечный препарат избирательных блокаторов $\alpha 7$ -нХР – MLA

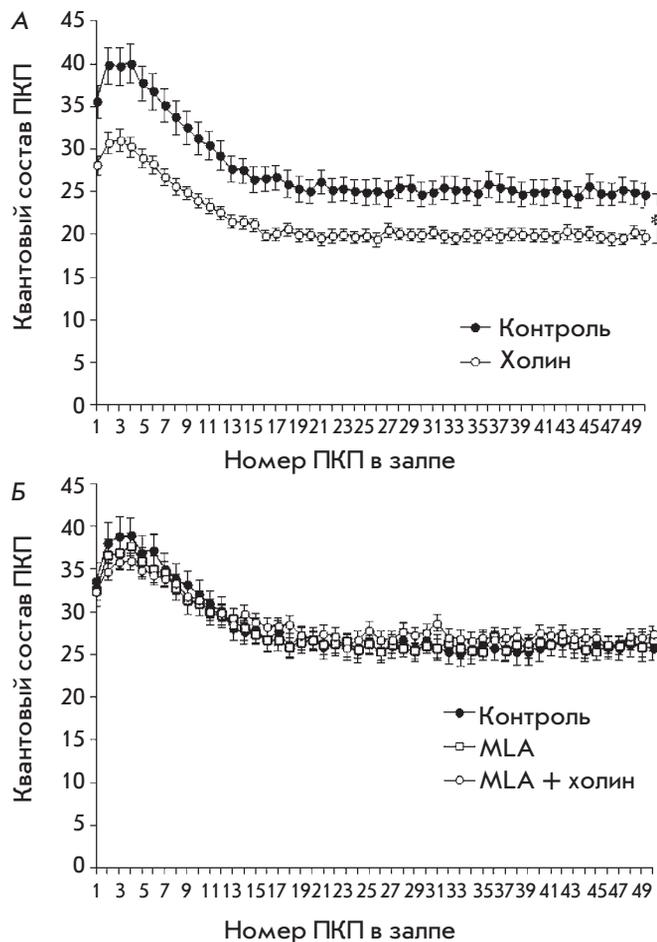


Рис. 2. Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа ПКП при ритмической активности синапсов с частотой 50 Гц. А – в контроле и под действием 100 мкМ холина. Б – в контроле, в присутствии 20 нМ MLA и при действии холина на фоне MLA. По осям ординат – значения квантового состава ПКП, по осям абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

(20 нМ) (рис. 2Б) или СТх (5 нМ) не вызвала изменений параметров МПКП, а также квантового состава ПКП в высокочастотном коротком залпе. Вместе с тем на фоне этих блокаторов $\alpha 7$ -нХР холин не оказывал тормозного действия на квантовый состав ПКП в залпах (рис. 2Б).

С целью выяснения механизма тормозного действия холина мы предположили, что активация холином $\alpha 7$ -нХР, пропускающих кальций в терминаль, создает в терминалях кальциевый сигнал, который может активировать кальций-зависимые низкопроводящие калиевые каналы SK-типа – подобно тому, как это происходит в случае тормозного действия АХ

на импульсную активность ряда других возбудимых клеток [23, 24]. Для проверки такой возможности проводили аппликацию на мышцу избирательного блокатора низкопроводящих K_{Ca} -каналов – апамина (200 нМ). Сам апамин не вызывал статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава одиночных и ритмически генерируемых ПКП, но на его фоне холин (100 мкМ) терял способность подавлять квантовый состав ПКП в ритмическом залпе (рис. 3А). Это позволяет предполагать, что тормозное действие экзогенного холина – кальций-зависимый процесс, в основе которого лежит активация холином входа кальция в терминаль по каналам $\alpha 7$ -нХР, вызывающий активацию калиевых SK-каналов и выходящий калиевый ток. Возникающая при этом гиперполяризация мембраны подавляет работу потенциал-зависимых кальциевых каналов в активных зонах, что снижает вероятность вызванного выброса АХ.

Согласно опубликованным данным, SK-каналы могут активироваться кальцием из разных источников [25]. В частности, в определенных гиппокампальных синапсах [24] работа SK-каналов усиливается за счет кальций-активируемого выброса кальция из депо, вызванного входом кальция из наружной среды по каналам $\alpha 7$ -нХР. Поэтому целью следующей серии экспериментов было выяснение возможного вовлечения рианодиновых рецепторов и выброса кальция из кальциевых депо моторных терминалей в реализацию кальций-зависимых тормозных эффектов холина с участием K-каналов SK-типа.

Аппликация на мышцу рианодина в концентрации, обратимо блокирующей рианодиновые рецепторы (3 мкМ), не вызывала статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава ПКП и в незначительной степени снижала облегчение передачи в начале короткого залпа ПКП (рис. 3Б). На фоне действия рианодина (3 мкМ) последующая аппликация холина не вызвала снижения амплитуды и квантового состава ПКП в залпе (рис. 3Б). Это свидетельствует о необходимости участия не только $\alpha 7$ -нХР, но и выброса депонированного кальция в реализации кальций-зависимого торможения холином вызванной секреции АХ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты, обнаруженные нами при аппликации экзогенного холина (100 мкМ), а также селективных блокаторов $\alpha 7$ -нХР (метилликаконитина и α -кобраторксина), в сочетании с эффектами ингибитора SK-каналов (апамина) и блокатора рианодиновых рецепторов (рианодина) позволили приблизиться к пониманию механизма тормозного действия холина на вызванный выброс АХ.

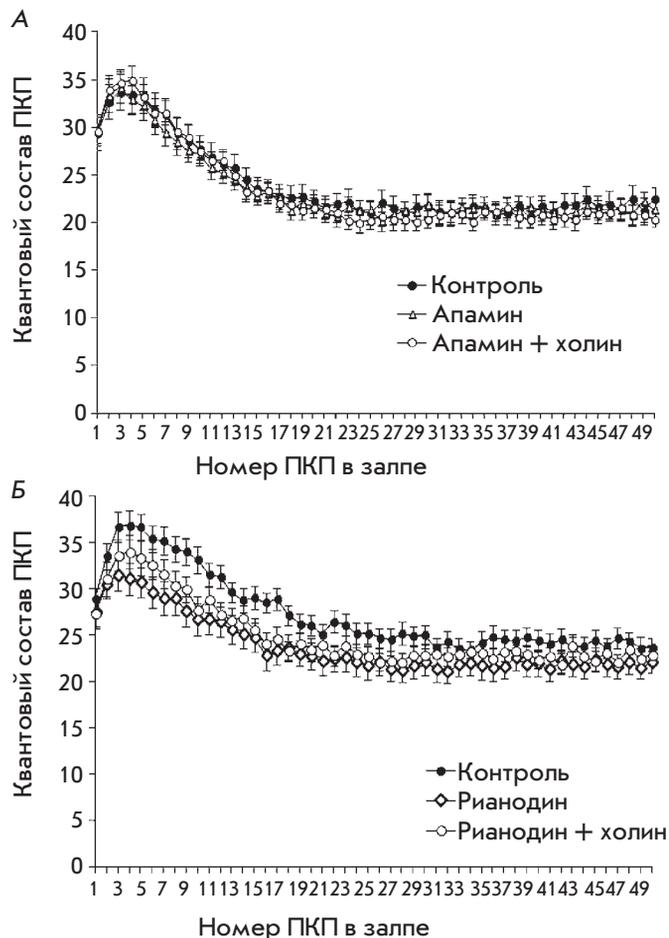


Рис. 3. Изменение квантового состава по ходу короткого ритмического залпа ПКП с частотой 50 Гц. А – в контроле, при действии 200 нМ апамина и под действием холина (100 мкМ) на фоне апамина. Б – в контроле, при действии 3 мкМ рианодина и под действием холина (100 мкМ) на фоне рианодина. По осям ординат – значения квантового состава ПКП, по осям абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе

Способность ряда эндогенных и экзогенных агонистов нейрональных нХР при кратковременной (в течение нескольких секунд) аппликации в высоких миллимолярных дозах вызывать снижение секреции ацетилхолина в моторных синапсах наблюдали ранее в ряде работ [5, 8, 17]. Однако не было точно установлено, какой именно тип пресинаптических нХР опосредует эти эффекты и по какому механизму они реализуются. Известно, что холин является полным избирательным агонистом $\alpha 7$ -нХР, но в то же время он может активировать и M_1 -холинорецепторы, имеющиеся на терминалях и шванновских клетках моторных синапсов [26]. Однако, согласно опубликованным данным, холин активирует эти рецепторы

в дозах, значительно превышающих применяющуюся в нашей работе [27, 28]. Кроме того, избирательная активация M_1 -холинорецепторов моторных синапсов приводит к облегчению выброса медиатора [29, 30] и, таким образом, не может быть причиной обнаруженного нами тормозного действия экзогенного холина на секрецию АХ. Поэтому при объяснении обнаруженных нами эффектов холина мы опирались на хорошо документированные и общеизвестные факты о способности холина избирательно активировать $\alpha 7$ -нХР нервных терминалей [31, 32].

Мы использовали протокол, в котором применяли тоническую – в течение десятков минут – аппликацию холина в низкой (100 мкМ) концентрации, которая не достигает EC_{50} для активации $\alpha 7$ -нХР (0.5–1.5 мМ) [31, 33]. Известно, что $\alpha 7$ -нХР относятся к очень быстро десенситизируемым холинорецепторам [34]. Однако, согласно десенситизационной модели для $\alpha 7$ -нХР, низкие (не достигающие EC_{50}) концентрации агонистов приводят к пролонгированному открытию канала $\alpha 7$ -нХР с незначительным развитием десенситизации или блоку открытого канала при негативных (гиперполяризационных) значениях мембранного потенциала [32]. Тот факт, что снижение холином квантового состава ПКП предотвращается блокаторами $\alpha 7$ -нХР, означает, что действие холина в данной концентрации (100 мкМ) реализуется через активацию, а не десенситизацию нейрональных нХР на пресинаптической мембране. Долговременный характер наблюдаемых эффектов холина может быть следствием процессов, разыгрывающихся при активации $\alpha 7$ -нХР. Недавно на претерминальных аксонах гиппокампальных нейронов показали, что даже кратковременная (10 мин) активация $\alpha 7$ -нХР экзогенными агонистами может приводить (вслед за быстрыми эффектами) к долговременным – в течение 30 мин и более – внутриклеточным подъемам уровня кальция, активации кальмодулинкиназы типа II и других ферментов, что сопровождается долговременным усилением секреции медиатора [35].

В периферических синапсах при активации холином пресинаптических $\alpha 7$ -нХР мы обнаружили другой эффект – долговременное торможение секреции вследствие вовлечения в работу кальций-зависимых низкопроводящих калиевых каналов SK-типа. Такие каналы описаны на моторных нервных терминалях грызунов [36]. Показано их возможное участие в регуляции частоты спонтанных МПКП [37]. В нашей работе впервые обнаружена возможность активации и участие SK-каналов в реализации тормозного действия холина на вызванный выброс АХ. Аналогичные примеры срабатывания SK-каналов вследствие активации $\alpha 7$ -нХР описаны в центральных синапсах волосковых клеток [23], нейронах гиппокампа [24].

Применение рианодина как блокатора рианодинных рецепторов выявило необходимость участия еще и рианодин-чувствительного выброса кальция из депо для реализации тормозных эффектов холина. В центральной нервной системе функциональное сопряжение работы $\alpha 7$ -нХР и рианодинных рецепторов служит для усиления кальциевого сигнала в терминалях и облегчения выброса ацетилхолина или других медиаторов [14, 38, 39]. Мы впервые показали, что в периферических синапсах, напротив, функциональное взаимодействие $\alpha 7$ -нХР и рианодинных рецепторов кальциевых депо приводит к торможению вызванной секреции медиатора вследствие активации кальций-зависимых калиевых каналов SK-типа. По-видимому, в моторных нервных терминалях $\alpha 7$ -нХР расположены на удалении от мест экзоцитоза, но пространственно сближены с определенными примембранными цистернами рианодинных кальциевых депо, и этот комплекс способен активировать калиевые каналы SK-типа. Аналогичное взаимодействие $\alpha 7$ -нХР, рианодинных рецепторов и SK-каналов описано в интернейронах гиппокампа на постсинаптическом уровне [24], у волосковых клеток [40]. В обоих случаях это приводило к торможению нейрональной активности.

Хорошо известно, что в центральной нервной системе внеклеточный АХ и его дериват холин через их диффузно-объемное действие могут регулировать активность внесинаптических и околосоинаптических $\alpha 7$ -нХР, локализованных на претерминальных аксонах, дендритах нейронов и телах глиальных клеток мозга [41]. Для периферических аксонов и терминалей мотонейронов подобная регуляция с участием АХ и холина еще не была описана. Уровень выброса ацетилхолина и активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных синапсах гораздо выше, чем в центральных холинергических синапсах [41]. Следовательно, при долговременной работе синапсов и гидролизе АХ должен значительно возрастать уровень эндогенного холина в синаптической щели. Его диффузия из щели и активация пресинаптических $\alpha 7$ -нХР могли бы служить механизмом эндогенной ауторегуляции секреции АХ по принципу отрицательной обратной связи. Однако нам не удалось обнаружить эффекты эндогенного холина на выброс АХ в условиях одиночной и кратковременной ритмической активности синапсов. Вопреки ожиданиям аппликация блокаторов $\alpha 7$ -нХР не вызвала каких-либо изменений квантового состава одиночных ПКП и ПКП в коротких ритмических залпах (50 ПКП, 50 Гц). Возможно, требуются периоды более продолжительной или интенсивной работы моторных синапсов для накопления эндогенного холина, его диффузии из щели (спилловера) и проявления его тормозного

действия, особенно если пресинаптические $\alpha 7$ -нХР удалены от мест экзоцитоза, как, например, в претерминальных $\alpha 7$ -нХР в центральных синапсах [42]. Правомочность подобных представлений подтверждается данными экспериментов на синапсах диафрагмы крысы, в которых способность блокаторов $\alpha 7$ -нХР предотвращать падение квантового состава ПКП удастся выявить только, если это падение развивается в результате длительной (в течение нескольких часов) низкочастотной работы синапсов [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показано, что тоническое действие экзогенного холина, взятого в относительно низких для активации $\alpha 7$ -нХР дозах, приводит к долговременному торможению выброса медиатора АХ.

Впервые раскрыт механизм этого торможения. Он заключается в активации холином пресинаптических аксональных $\alpha 7$ -нХР с последующим выбросом депонированного кальция через рианодинорные рецепторы и активацией K_{Ca} -каналов SK-типа в моторных терминалях мышцы. Нельзя исключить и других возможных участников описанного механизма, например, определенных кальций-зависимых ферментов, однако это требует специальных исследований. Заманчиво также проверить, может ли холин-зависимое торможение секреции медиатора вносить вклад в утомление нервно-мышечной передачи в случае долговременной интенсивной работы моторных синапсов млекопитающих. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-00413а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Katz B., Miledi R. // J. Physiol. 1973. V. 231. № 3. P. 549–574.
- Albuquerque E.X., Pereira E.F., Alkondon M., Rogers S.W. // Physiol. Rev. 2009. V. 89. № 1. P. 73–120.
- Sine S.M. // Physiol. Rev. 2012. V. 92. № 3. P. 1189–1234.
- Vizi E.S., Somogyi G.T. // Br. J. Pharmacol. 1989. V. 97. № 1. P. 65–70.
- Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G. // J. Physiol. 1994. V. 476. № 3. P. 517–529.
- Tsuneki H., Kimura I., Dezaki K., Kimura M., Sala C., Fumagalli G. // Neurosci. Lett. 1995. V. 196. № 1–2. P. 13–16.
- Faria M., Oliveira L., Timóteo M.A., Lobo M.G., Correia-De-Sá P. // Synapse. 2003. V. 49. № 2. P. 77–88.
- Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G. // Br. J. Pharmacol. 1997. V. 122. № 6. P. 1025–1034.
- Dehkordi O., Haxhiu M.A., Millis R.M., Dennis G.C., Kc P., Jafri A., Khajavi M., Trough C.O., Zaidi S.I. // Respir. Physiol. Neurobiol. 2004. V. 141. № 1. P. 21–34.
- Castro N.G., Albuquerque E.X. // Biophys. J. 1995. V. 68. № 2. P. 516–524.
- Fucile S. // Cell Calcium. 2004. V. 35. № 1. P. 1–8.
- Uteshev V.V. // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. V. 740. P. 603–638.
- Gray R., Rajan A.S., Radcliffe K.A., Yakehiro M., Dani J.A. // Nature. 1996. V. 24. P. 383. № 6602. P. 713–716.
- Sharma G., Vijayaraghavan S. // Neuron. 2003. V. 38. № 6. P. 929–939.
- Jiang L., Role L.W. // J. Neurophysiol. 2008. V. 99. № 4. P. 1988–1999.
- Kalappa B.I., Feng L., Kem W.R., Gusev A.G., Uteshev V.V. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2011. V. 301. № 2. P. C347–361.
- Prior C., Singh S. // Br. J. Pharmacol. 2000. V. 129. № 6. P. 1067–1074.
- Балезина О.П., Федорин В.В., Гайдуков А.Е. // Бюл. эксп. биол. и мед. 2006. Т. 142. № 1. С. 17–21.
- Alkondon M., Albuquerque E.X. // Eur. J. Pharmacol. 1990. V. 191. № 3. P. 505–506.
- Servent D., Antil-Delbeke S., Gaillard C., Corringer P.J., Changeux J.P., Ménez A. // Eur. J. Pharmacol. 2000. V. 393. № 1–3. P. 197–204.
- Tsetlin V.I., Hucho F. // FEBS Lett. 2004. V. 557. № 1–3. P. 9–13.
- McLachlan E.M., Martin A.R. // J. Physiol. 1981. V. 311. P. 307–324.
- Yuhus W.A., Fuchs P.A. // J. Comp. Physiol. A. 1999. V. 185. № 5. P. 455–462.
- Griguoli M., Scuri R., Ragozzino D., Cherubini E. // Eur. J. Neurosci. 2009. V. 30. № 6. P. 1011–1022.
- Adelman J.P., Maylie J., Sah P. // Annu. Rev. Physiol. 2012. V. 74. P. 245–269.
- Wright M.C., Potluri S., Wang X., Dentcheva E., Gautam D., Tessler A., Wess J., Rich M.M., Son Y.J. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 47. P. 14942–14955.
- Ulus I.H., Millington W.R., Buyukuysal R.L., Kiran B.K. // Biochem. Pharmacol. 1988. V. 37. № 14. P. 2747–2755.
- Fischer V., Both M., Draguhn A., Egorov A.V. // J. Neurochem. 2014. V. 129. № 5. P. 792–805.
- Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E. // Eur. J. Neurosci. 2002. V. 15. № 3. P. 439–448.
- Santafé M.M., Lanuza M.A., Garcia N., Tomàs J. // Eur. J. Neurosci. 2006. V. 23. № 8. P. 2048–2056.
- Alkondon M., Pereira E.F., Cortes W.S., Maelicke A., Albuquerque E.X. // Eur. J. Neurosci. 1997. V. 9. № 12. P. 2734–2742.
- Papke R.L., Bencherif M., Lippiello P. // Neurosci. Lett. 1996. V. 213. № 3. P. 201–204.
- Papke R.L., Porter Papke J.K. // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 137. № 1. P. 49–61.
- Giniatullin R., Nistri A., Yakel J.L. // Trends Neurosci. 2005. V. 28. № 7. P. 371–378.
- Zhong C., Talmage D.A., Role L.W. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. P. e82719.
- Roncarati R., Di Chio M., Sava A., Terstappen G.C., Fumagalli G. // Neuroscience. 2001. V. 104. № 1. P. 253–262.
- Балезина О.П., Букия А.Н., Лаптева В.И. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2005. Т. 91. № 1. С. 61–70.
- Dickinson J.A., Kew J.N., Wonnacott S. // Mol. Pharmacol. 2008. V. 74. № 2. P. 348–359.
- Shen J.X., Yakel J.L. // Acta Pharmacol. Sin. 2009. V. 30. № 6. P. 673–680.
- Lioudyno M., Hiel H., Kong J.H., Katz E., Waldman E., Parameshwaran-Iyer S., Glowatzki E., Fuchs P.A. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 49. P. 11160–11164.
- Descarries L., Gisiger V., Steriade M. // Prog. Neurobiol. 1997. V. 53. № 5. P. 603–625.
- Jones I.W., Wonnacott S. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 50. P. 11244–11252.

УДК 577.113.(7 + 4): 547.327

Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот

М. С. Купрюшкин, Д. В. Пышный, Д. А. Стеценко*

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

*E-mail: dast@niboch.nsc.ru

Поступило в редакцию 28.09.2014

РЕФЕРАТ Описан новый класс аналогов нуклеиновых кислот, содержащих фосфорилгуанидиновую группу. Окисление связанного с полимерным носителем динуклеозид- β -цианэтилфосфита йодом в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина приводит к образованию динуклеотида, содержащего незаряженную тетраметилфосфорилгуанидиновую группу (Tmg), в качестве основного продукта. Tmg-группа устойчива в условиях твердофазного олигонуклеотидного синтеза, последующего удаления защитных групп и отщепления олигонуклеотида от полимерного носителя аммонолизом. Олигонуклеотиды, содержащие Tmg-группу, способны связываться с комплементарными последовательностями ДНК и РНК со средством, лишь незначительно отличающимся от средства природных олигодезоксирибонуклеотидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аналоги нуклеиновых кислот, модифицированный олигонуклеотид, твердофазный синтез, тетраметилгуанидин, фосфорилгуанидин, фосфит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с последующим применением времяпролетного масс-анализатора; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; TMG – 1,1,3,3-тетраметилгуанидин.

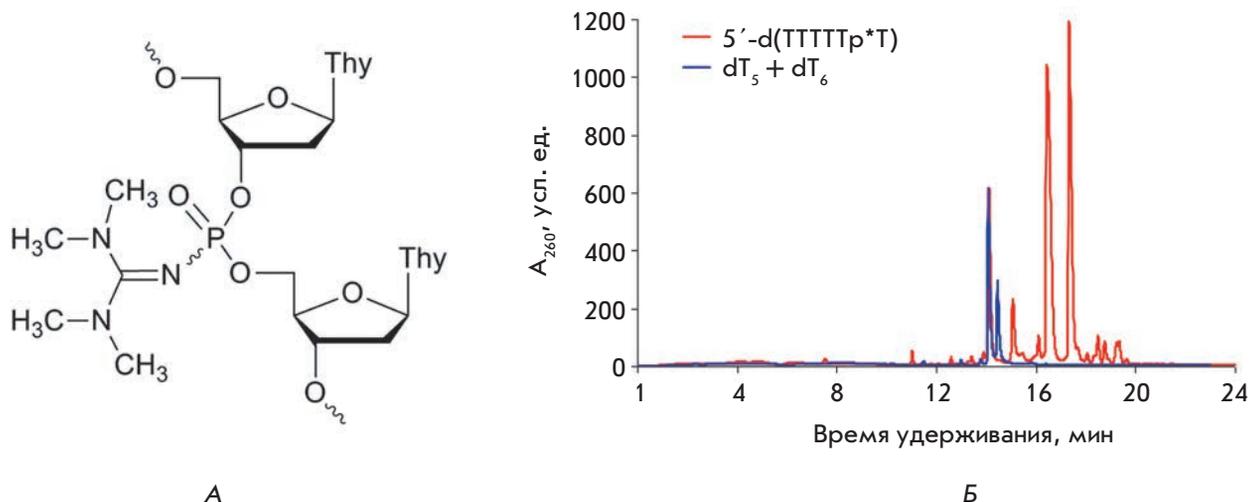
Аналоги нуклеиновых кислот различной структуры широко используются в молекулярно-биологических исследованиях, а также рассматриваются в качестве перспективных терапевтических средств и зондов для молекулярной диагностики [1, 2]. Однако в настоящее время главным препятствием, сдерживающим широкое внедрение производных нуклеиновых кислот, является недостаточное проникновение олигонуклеотидов в клетки в отсутствие особых трансфекционных агентов или доставочных платформ. Считается, что одна из основных причин неэффективного проникновения олигонуклеотидных производных в клетку – их большой суммарный отрицательный заряд.

За последние 20 лет относительно хорошо были изучены только два типа аналогов нуклеиновых кислот с формально электронейтральным остовом – пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) [3] и фосфоридамидные морфолиноолигонуклеотиды (PMO) [4]. Аналоги обоих типов способны к комплементарному связыванию с природными молекулами ДНК и РНК, и в силу этого они нашли применение как в молекулярной биологии, так и, в особенности, в медицине в качестве потенциальных лекарственных препаратов [5, 6]. Таким образом, поиск новых аналогов нуклеиновых кислот, на основе которых возможна разработка олигонуклеотидных терапевтических

средств, способных эффективно проникать в клетки в отсутствие трансфекционных агентов или иных средств доставки, остается весьма актуальной задачей.

Мы показали, что окисление 3',5'-дитимидин- β -цианэтилфосфита йодом в пиридине в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина (TMG) приводит к образованию динуклеотида с межнуклеотидной тетраметилфосфорилгуанидиновой группой (Tmg) в качестве основного продукта (*рисунком А*) (аналогично, окисление триалкилфосфитов йодом в пиридине в присутствии первичного амина приводит к образованию фосфорамидов [7]). Твердофазный олигонуклеотидный синтез был продолжен до получения гексатимидилата. Олигонуклеотид отщепляли от полимера 25% водным раствором аммиака при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего аммиак удаляли в вакууме, и раствор, содержащий олигонуклеотид, анализировали при помощи ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

На профиле элюции реакционной смеси (*рисунком Б*) видно, что основным продуктом является олигонуклеотид 5'-d(T₃p*Т), где p* обозначает положение Tmg-группы. Модифицированному олигонуклеотиду соответствуют два пика с τ_R 16.7 и 17.6 мин, которые можно отнести к отдельным диастереомерам в силу хиральности межнуклеотидной фос-



А – структура олигонуклеотида с межнуклеотидной тетраметилфосфорилгуанидиновой группой (Тmg). Б – профиль элюции олигонуклеотида 5'-d(T₅p*T), где p* – положение Тmg-группы. ОФ-ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 (США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм в градиенте ацетонитрила (0 → 40%) в 20 мМ ацетате триэтиламмония, рН 7 в течение 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин

форилгуанидиновой группы. В качестве побочного продукта присутствует также немодифицированный олигонуклеотид dT₆ с τ_Р 14.3 мин, который, вероятно, образуется в результате гидролиза промежуточного реакционноспособного йодфосфониевого производного следами влаги. Следует отметить выраженный гидрофобный характер Тmg-группы, проявляющийся в увеличении времени удерживания τ_Р олигонуклеотида с Тmg-группой по сравнению со временем удерживания немодифицированного олигонуклеотида. Были синтезированы модифицированные олиготимидилаты длиной до 20 нуклеотидов с одной

или двумя Тmg-группами в разных положениях олигонуклеотидной цепи. Наличие тетраметилфосфорилгуанидиновых групп в составе олигонуклеотидов подтверждено данными масс-спектрометрии MALDI-TOF (таблица).

Эксперименты по термической денатурации с оптической регистрацией сигнала при концентрации каждого олигонуклеотида 10⁻⁵ М в 10 мМ Na-какодилатном буфере рН 7.2, содержащем 100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl₂, выявили относительно незначительное влияние изолированной Тmg-группы на 3'-конце и в середине цепи

Структура и молекулярные массы фосфорилгуанидиновых производных олигонуклеотидов, содержащих Тmg-группу

№	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Молекулярная масса [#]		
		расчет [М]	эксперимент	
			[М + Н] ⁺	[М - Н] ⁻
1	d(TTTTTp*T)	1860.39	1860.35	1857.54
2	d(Tp*TTTTT)	1860.39	1860.34	1858.63
3	d(TCp*A)	941.80	942.17	938.97
4	d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTp*T)	6119.16	6121.13	6113.80
5	d(TTTTTTTTTTTTTp*TTTTTTTTT)	6119.16	6121.54	–
6	d(TTp*TTTTTTTTTTTTTTTTTTT)	6119.16	6120.01	6114.19
7	d(TTp*TTTTTTTTTTTTTTTTTTTp*T)	6216.33	–	6221.11

p* – положение Тmg-группы.

[#]Спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Bruker Reflex III Autoflex Speed (Германия) в варианте положительных или отрицательных ионов с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы.

на стабильность комплементарного комплекса, образованного модифицированными олигодезоксирибонуклеотидами с матрицами поли(dA) и поли(rA) по сравнению с контрольным олигонуклеотидом dT₂₀. Температуры плавления (T_m) комплексов на матрице поли(rA) составили 48°C для 5'-d(T₁₉p*Т) и 46.5°C для 5'-d(T₁₁p*Т₉), 54 и 52.5°C на матрице поли(dA) соответственно, что достаточно близко к T_m комплексов, образованных олигонуклеотидом dT₂₀ на тех же матрицах – 48 и 55°C соответственно. Индивидуальные диастереомеры d(T₁₉p*Т), которые смогли разделить при помощи ОФ-ВЭЖХ, на матрице dC₂A₂₀C₂ показали незначительно различающиеся значения T_m – 45.8°C у диастереомера с меньшим временем удерживания и 45.1°C у диастереомера с большим временем удерживания по сравнению с 45°C у немодифицированного олигонуклеотида dT₂₀. Комплекс олигонуклеотида с модификацией в середине цепи d(T₁₁p*Т₉), полученного в виде смеси диастереомеров, плавился при 44.7°C. Эти результаты тем более неожиданные, поскольку при замещении межнуклеотидного фосфата тетраметилфосфорилгуанидиновой группой на место одного атома кислорода входит группировка из 20 атомов (считая и атомы водорода). Полученные данные свидетельствуют, что модифицированные Tmg-группами олигодезоксирибонуклеотиды могут образовывать устойчивые комплементарные комплексы с ДНК и РНК, лишь незначительно отличающиеся по своей термической стабильности от нативных, что, в частности, необходимо для проявления терапевтической активности.

Таким образом, нами описан новый класс фосфорилгуанидиновых аналогов нуклеиновых кислот [8], третий в мировой практике класс формально электронейтральных производных олигонуклеотидов наряду с уже известными пептидными нуклеиновыми кислотами и морфолиновыми олигомерами. Полученные результаты свидетельствуют, что окисление межнуклеотидного фосфита йодом в пиридине в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина может служить удобным методом получения производных олигонуклеотидов с тетраметилфос-

форилгуанидиновой (Tmg) группой. Важно отметить, что, в отличие от предложенных ранее олигонуклеотидных аналогов, а именно РНА и РМО, синтез фосфорилгуанидиновых производных можно проводить в рамках обычной амидофосфитной химии с использованием стандартного синтезатора ДНК. Появляется возможность получения разнообразных фосфорилгуанидиновых олигомеров с использованием широкого спектра коммерчески доступных амидофосфитных мономеров, включая модифицированные по углеводным остаткам и гетероциклическим основаниям.

Показано, что Tmg-группа устойчива в условиях твердофазного олигонуклеотидного синтеза, последующего удаления защитных групп и отщепления от полимерного носителя гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов при помощи 25% водного раствора аммиака в течение 16 ч при 55°C. Олигонуклеотиды, содержащие одну или несколько Tmg-групп, связываются с комплементарными последовательностями ДНК и РНК со сродством, лишь незначительно отличающимся от сродства природных олигодезоксирибонуклеотидов, несмотря на пространственно-затрудненный характер Tmg-группы. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о возможности использования нового класса фосфорилгуанидиновых аналогов нуклеиновых кислот для создания новых биологически активных производных олигонуклеотидов. ●

Авторы выражают благодарность М. Касакину за помощь в регистрации масс-спектров и А. Ломзову за проведение экспериментов по термической денатурации.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Правительства Российской Федерации для научных проектов, выполненных под руководством ведущих мировых ученых (соглашение № 14.В25.31.0028 с С. Альтманом как ведущим ученым), и гранта РФФИ № 13-04-01176.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Therapeutic Oligonucleotides: Methods and Protocols. Methods Mol. Biol. / Ed. Goodchild J. N.Y.: Humana Press, 2011. V. 764. 340 p.
2. Bell N.M., Micklefield J. // ChemBioChem. 2009. V. 10. № 17. P. 2691–2703.
3. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Berg R.H. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. № 5. P. 1895–1897.
4. Summerton J., Weller D. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997. V. 7. № 3. P. 187–195.
5. Nielsen P.E. // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. № 3. P. 233–248.
6. Karkare S., Bhatnagar D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 5. P. 575–586.
7. Jäger A., Levy M.J., Hecht S.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 19. P. 7237–7246.
8. Стеценко Д.А., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В. Заявка на ВО патент РСТ/RU2014/000647, приоритет от 22.08.2014.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков (примерно 40 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков (20 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись следует присылать в редакцию в электронном виде: текст в формате Word 2003 for Windows, рисунки в формате TIFF. Отдельным файлом присылается перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, списка литературы и подписей к рисункам.

При подаче статьи авторы заключают с редакцией договор о передаче права на использование произведения. Форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru. Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала *Acta Naturae*, или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 628.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с коррек-

турой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком*.

- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3 – 6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сноска, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК·РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзыва.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде PDF-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

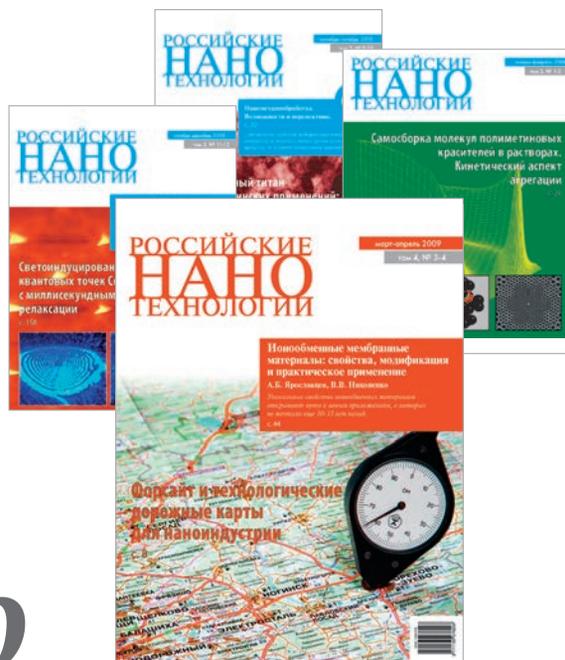
Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ



Что нового в области нанотехнологий?

узнай всего за 7200 рублей

7200 РУБЛЕЙ – ЦЕНА ГОДОВОЙ ПОДПИСКИ, ВКЛЮЧАЯ НДС

20% СКИДКА:

❖ физическим лицам

**Электронная версия журнала
еще дешевле – 4400 рублей в год**

или через Научную электронную
библиотеку: elibrary.ru

Альтернативные агентства:

Урал-пресс www.ural-press.ru,

Информнаука www.informnauka.com

Подписка в редакции:

119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1,
строение 75Г, офис 321

Телефон/ факс: +7 (495) 930 87 07

E-mail: podpiska@nanorf.ru,

nsoboleva@strf.ru

Web-site: www.nanoru.ru, www.nanorf.ru