

Письмо редакторов



Дорогие читатели *Acta Naturae*! Открывая очередной номер нашего журнала, мы хотели бы прежде всего поздравить всех нас со знаменательным событием – по данным Thomson Reuters наш импакт-фактор достиг 0.872. Таким образом, мы вышли на второе место среди российских журналов для наук о жизни, уступая только «Биохимии». За год наш IF увеличился почти вдвое! Пусть это не покажется похвалой, но мы считаем это большим успехом. Решающим фактором, как нам кажется, было наше стремление войти в международные базы данных и, прежде всего, свободный доступ к журналу в Интернете. Думается, что мы с вами ни в коем случае не должны останавливаться на достигнутом, ведь на международном уровне 0.872 – весьма скромный показатель. Выражаем уверенность, что дружная работа редколлегии, издателей и, прежде всего, наших авторов позволит и дальше повышать рейтинг *Acta Naturae*.

Теперь о новом номере. Его предваряет отчет о проведенной в Сочи Третьей Международной конференции «Генетика старения и долголетия». Жизнь так устроена, что с течением времени эта проблема начинает волновать каждого из нас. На примере конференции отчетливо видно, насколько глубоко в настоящее время молекулярные методы внедряются в медицину и как велик прогресс в геронтологии. Давайте жить дольше и веселее!

В номере весьма велико число обзоров, и тематика их разнообразна. Кардиотоксинам кобр и их антибактериальной активности посвящен обзор П.В. Дубовского и Ю.Н. Уткина. А.А. Немудрый и др. пишут о новейших методах редактирования геномов (системах TALEN и CRISPR) и их применении для редактирования и функционального скрининга геномов, создания клеточных

моделей наследственных заболеваний человека, изучения эпигеномов и визуализации клеточных процессов. Обзор казанских микробиологов (В.М. Чернов и др.) посвящен контаминации клеточных культур микоплазмами. Любопытный исследователь, использующий методы клеточной биологии, сталкивается с этой проблемой, и обзор, безусловно, будет весьма интересен для самого широкого круга читателей. Молекулярным основам репарации ДНК посвящена публикация В.В. Коваля, Д.Г. Кнорре и О.С. Федоровой. И, наконец, обзор И.М. Лариной и др. анализирует подходы дисциплин OMICs (протеомики, транскриптомики, метаболомики) к более глубокому пониманию физиологической адаптации здорового человека в экстремальных условиях.

Вашему вниманию предлагается также три полноразмерные экспериментальные статьи и одно краткое сообщение. Статья И.В. Голубева и др. посвящена белковой инженерии оксидазы D-аминокислот, фермента, имеющего существенное значение для биотехнологии. Е.В. Четина и др. исследовали взаимосвязь между экспрессией генов структурных белков внеклеточного матрикса, протеиназ и их ингибиторов при развитии плода. Публикация Н. Ю. Глазовой также связана с воспроизводством млекопитающих и посвящена влиянию антидепрессанта флувоксамина на неонатальное развитие. Завершающее номер краткое сообщение А.П. Якимова и др. описывает клонирование гена *ribT*, входящего в оперон биосинтеза рибофлавина *Bacillus subtilis*.

Надеемся, что публикации этого выпуска *Acta Naturae* будут для вас интересны и полезны, ждем ваших комментариев и новых статей!

До встречи в следующем номере! ●

Редколлегия

15-17 ОКТЯБРЯ 2014

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
ЭКСПОФОРУМ



ПЕТЕРБУРГСКИЙ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ
ФОРУМ
ЗДОРОВЬЯ



**МЕДИЗ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**
Медицина и здоровье
www.mediz-spb.ru



ФАРМАЦИЯ
www.pharma.primexpo.ru



БИОИНДУСТРИЯ
www.bio.expoforum.ru



**ЛЕЧЕБНО-
ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫЙ
ТУРИЗМ**
www.healthtourism.primexpo.ru



VISUS-EXPO
www.kmc-med.com



ЭСТЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
www.primexpo.ru

www.pmfz.expoforum.ru

+7 812 240 40 40

EXPOFORUM

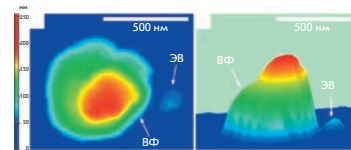


0+



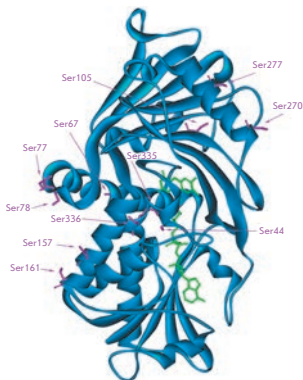
Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов

В. М. Чернов, О. А. Чернова, Х. Т. Санчес-Вега, А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская
Клеточные культуры подвержены контаминации как клетками других культур, так и микроорганизмами. Особое значение имеет контаминация клеточных культур микоплазмами. В обзоре рассмотрены особенности микоплазм и их внеклеточных везикул, а также взаимодействие контаминантов с клетками эукариот, проанализированы проблемы современных способов диагностики, эрадикации микоплазменной контаминации клеточных культур и перспективы их решения.



Клетки культуры *A. laidlawii* PG8

Исследование взаимосвязи структура–функция–стабильность в дрожжевой оксидазе D-аминокислот: гидрофобизация альфа-спиралей



И. В. Голубев, Н. В. Комарова, К. В. Рыженкова, Т. А. Чубарь, С. С. Савин, В. И. Тишков

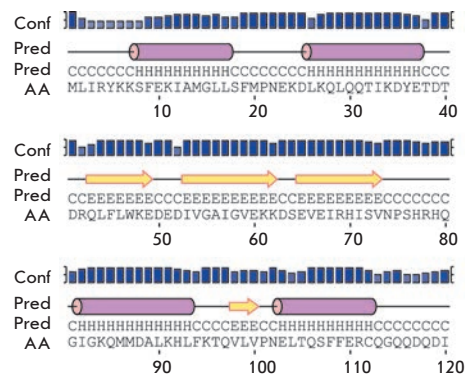
В рамках подхода по повышению термостабильности белков за счет гидрофобизации α -спиралей для оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO, [КФ 1.4.3.3]) получено 8 мутантов с заменами Ser/Ala. Мутации в положениях 78, 270, 277 и 336 приводили к дестабилизации фермента, замены Ser77Ala и Ser335Ala на стабильность TvDAAO почти не влияли, а замены Ser67Ala и Ser105Ala повысили термостабильность в 1.5 и 2 раза. Значение k_{cat}/K_M у TvDAAO Ser105Ala с рядом D-аминокислот была в 1.2–3 раза выше, чем у исходного фермента.

Общий вид субъединицы TvDAAO с остатками Ser, расположенными в α -спиральных участках

Возможная функция гена *ribT* *Bacillus subtilis*: теоретическое предсказание, клонирование и экспрессия

А. П. Якимов, Т. А. Серегина, А. А. Холодняк, Р. А. Кренева, А. С. Миронов, Д. А. Перумов, А. Л. Тимковский

Полная расшифровка функций и взаимодействия элементов оперона биосинтеза рибофлавина (*rib*-оперон) у *Bacillus subtilis* необходима для создания сверхпродуцентов этого важнейшего витамина. Функция гена *ribT*, замыкающего оперон, до сих пор не определена. В представленной работе проведен поиск гомологов гипотетической аминокислотной последовательности продукта этого гена в базах данных, а также анализ гомологий, теоретически предсказано распределение элементов вторичной структуры, предложена третичная структура белка RibT. Показана принципиальная возможность получения белка RibT в количествах, достаточных для дальнейшего изучения его структуры и функциональной активности.



Предсказание элементов вторичной структуры продукта гена *ribT*

Acta Naturae

ТОМ 6, № 3 (22), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: С.Б. Невская
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Директор по стратегическому развитию:
Е.Л. Пустовалова

Подготовка иллюстраций: И.А. Соловей, К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректурa: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.
Телефон/факс: +7 (495) 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 25 августа 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. В. Беликов, М. В. Шапошников,
А. А. Москалев

Для борьбы со старением
есть много путей 6

ОБЗОРЫ

П. В. Дубовский, Ю. Н. Уткин

Цитотоксины кобр: структурная
организация и антибактериальная
активность 12

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

Системы редактирования геномов
TALEN и CRISPR/Cas — инструменты
открытий 20

В. М. Чернов, О. А. Чернова, Х. Т. Санчес-Вега,
А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская

**Микоплазменные контаминации
клеточных культур: везикулярный
трафик у бактерий и проблема
контроля инфектогенов** 43

В. В. Коваль, Д. Г. Кнорре, О. С. Федорова

**Структурные особенности
взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-
гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК** 55

И. М. Ларина, В. А. Иванисенко,
Е. Н. Николаев, А. И. Григорьев

**Протеом здорового человека
при деятельности в экстремальных
условиях** 71

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. В. Голубев, Н. В. Комарова, К. В. Рыженкова,
Т. А. Чубарь, С. С. Савин, В. И. Тишков

**Исследование взаимосвязи
структура—функция—стабильность
в дрожжевой оксидазе D-аминокислот:
гидрофобизация альфа-спиралей** 82

E. V. Tchetina, F. Mwale, A. R. Poole

**Changes in Gene Expression Associated
with Matrix Turnover, Chondrocyte
Proliferation and Hypertrophy
in the Bovine Growth Plate** 95

Н. Ю. Глазова, С. А. Мерчиева, М. А. Володина,
Е. А. Себенцова, Д. М. Манченко, В. С. Кудрин,
Н. Г. Левицкая

**Влияние неонатального введения
флувоксамина на физическое развитие
и активность серотонинергической
системы белых крыс** 104

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А. П. Якимов, Т. А. Серегина, А. А. Холодняк,
Р. А. Кренева, А. С. Миронов, Д. А. Перумов,
А. Л. Тимковский

**Возможная функция гена *ribT* *Bacillus subtilis*:
теоретическое предсказание, клонирование
и экспрессия** 113

Правила для авторов 117

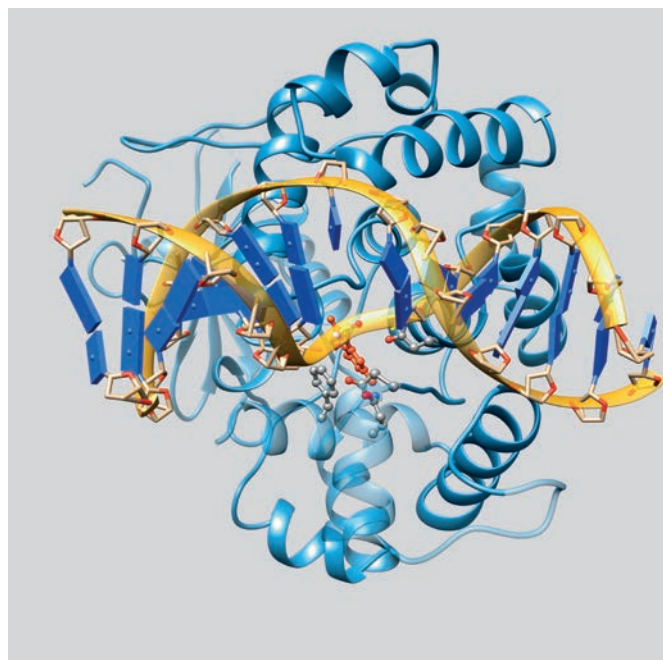


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

(См. обзор Ковалья)

Для борьбы со старением есть много путей

Итоги Третьей Международной конференции «Генетика старения и долголетия»

А. В. Беликов¹, М. В. Шапошников^{2,3}, А. А. Москалев^{1,2,3*}

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

³Сыктывкарский государственный университет, Сыктывкар, Россия

*E-mail: amoskalev@list.ru

С 6 по 10 апреля 2014 года в Сочи состоялась 3-я Международная конференция «Генетика старения и долголетия», в которой приняли участие более 300 делегатов из 18 стран. Помимо 50 устных докладов, прочитанных ведущими геронтологами мира, и обширной постерной сессии было проведено четыре круглых стола, посвященных разработке и интеграции теорий старения, развитию персонализированной медицины и привлечению венчурного капитала в научные исследования. Участники конференции подписали открытое письмо во Всемирную организацию здравоохранения с просьбой организовать сбор и интеграцию данных о возрастных патологиях по всему миру. По итогам конференции стал ясно виден прогресс в изучении старения и разработке технологий вмешательства в этот процесс. В частности, возможным стало определение соматических мутаций и повреждений ДНК в отдельных клетках; были охарактеризованы надежные маркеры биологического возраста; выявлены многие гены, аллели, процессы, метаболиты, кишечные бактерии и внешние воздействия, влияющие на скорость старения; созданы онлайн-базы данных возрастных изменений, а также геномов долгожителей и долгоживущих видов животных. Проводятся доклинические испытания лекарственных средств, с большой вероятностью способных замедлить старение, таких, как никотинамидрибозид, селективные ингибиторы TORC-1 и антитела-блокаторы рецептора к IGF-1. Предложены методы выращивания и трансплантации искусственных органов, адресной доставки лекарственных средств к индивидуальным клеткам и органеллам, направленного редактирования генома и внедрения искусственных хромосом.

В апреле 2014 года в Конгресс-центре отеля Radisson Blu Resort в пост-олимпийском Сочи состоялась 3-я Международная конференция «Генетика старения и долголетия», организованная Институтом биологии Коми НЦ УрО РАН совместно с фондом «Наука за продление жизни». Ученые 18 стран (Россия, США, Великобритания, Нидерланды, Германия, Италия,

Израиль, Китай, Иордания, Украина, Беларусь, Азербайджан, Польша, Узбекистан, Казахстан, Канада, Эстония, Швеция), работающие в разных областях биологии, медицины и информатики, а также предприниматели и инвесторы собрались на пять дней, объединенные желанием понять механизм(ы) старения и разработать способы предотвращения и, возможно, подавления процессов,

лежащих в основе всех возрастных заболеваний.

Ключевыми темами конференции стали поиск молекулярных мишеней лекарственных средств, замедляющих старение; расшифровка геномов долгожителей и долгоживущих видов животных; взаимосвязь генов, эпигенетической регуляции, обмена веществ, кишечной микрофлоры, образа жизни и окружающей

среды при определении продолжительности жизни индивида; разработка технологий искусственного выращивания, криоконсервации и трансплантации органов; использование нанокapsул и искусственных хромосом для редактирования генома.

Одним из актуальных направлений геронтологии остается поиск молекулярных мишеней, воздействие на которые с помощью фармакологических субстанций приведет к замедлению или остановке процесса старения. Так, Майкл Петрашек (Michael Petrascheck, The Scripps Research Institute, США) представил результаты проведенного на нематодах скрининга, в котором выявили 57 веществ с известной для млекопитающих фармакологией, которые увеличивают продолжительность жизни *Caenorhabditis elegans*, причем 16 из них более чем на 30%. Основными мишенями этих соединений оказались рецепторы к дофамину, серотонину, адреналину, норадреналину и гормонам. Большинство (33) из этих веществ также увеличивают устойчивость к окислительному стрессу. Брайан Кеннеди (Brian Kennedy, Buck Institute for Research on Aging, США) рассказал про исследования, направленные на отделение полезных эффектов рапамицина, в первую очередь увеличения продолжительности жизни, от его побочных эффектов, в частности, индукции инсулинорезистентности. Оказалось, что рапамицин ингибирует комплексы TORC-1 (полезные эффекты) и TORC-2 (побочные эффекты) при помощи различных механизмов. Это делает возможным разработку селективных ингибиторов TORC-1, которой занимается компания Delos Pharmaceuticals. В доклинических испытаниях наблюдали снижение выраженности побочных эффектов у этого нового

класса препаратов. Нир Барзилай (Nir Barzilai, Albert Einstein College of Medicine, США) сообщил, что инъекция инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), но не инсулина, в желудочки головного мозга старых крыс улучшает периферическую чувствительность к инсулину посредством рецептора к IGF-1. Он также указал на перспективность использования антител-блокаторов рецептора к IGF-1, неспособных преодолеть гематоэнцефалический барьер, чтобы снизить влияние IGF-1 на периферию (канцерогенное), но не на центральную нервную систему (защитное). Использование таких антител в сочетании с рапамицином позволило бы, возможно, минимизировать индуцируемую рапамицином инсулинорезистентность. Кроме того, само ингибирование гомолога IGF-1 – DAF-2 – продлевает жизнь нематод. Так, Дэвид Джэмс (David Gems, University College London, Великобритания) расширил наше понимание механизмов этого явления. Оказалось, что транскрипционный фактор DAF-16 активирует AAKG-4, субъединицу атипичной AMP-независимой AMP-киназы. Эта субъединица в свою очередь ускоряет активацию DAF-16 путем прямого фосфорилирования, она необходима для увеличения продолжительности жизни нематод, вызванного инактивацией DAF-2. Другая мишень DAF-16, транскрипционный фактор MDL-1, также способствует положительному воздействию инактивации DAF-2 на продолжительность жизни нематод.

Рапамицин, как следует из доклада Мэтт Кеберлейн (Matt Kaerberlein, University of Washington, США), продлевает жизнь и улучшает состояние мышечной массы с дефектом митохондриального комплекса I. Этих мышечных используют в качестве модельного организма

при изучении подострой некротизирующей энцефалопатии (синдром Лея). Как известно, количество дефектных митохондрий увеличивается при старении организма. Предполагается, что рапамицин предотвращает накопление продуктов гликолиза и лактоацидоза. М. Кеберлейн предположил также, что причиной митохондриального нарушения может быть истощение внутриклеточного NAD, поэтому в настоящее время изучается возможность восстановления уровня NAD при включении никотинамидрибозидов в рацион мышей, коррекции синдрома Лея и prolongation жизни. Никотинамидрибозид уже поступил в продажу в США под маркой NIAGEN™ в качестве витаминной добавки. Бланка Роджина (Blanka Rogina, University of Connecticut Health Center, США) сообщила, что белок DPGC-1 способствует увеличению продолжительности жизни дрозофил, обусловленной мутацией трансмембранного переносчика лимонной кислоты INDY, путем стимуляции биогенеза митохондрий и снижения уровня окислительного стресса. Пониженный уровень INDY в кишечнике поддерживает гомеостаз стволовых клеток и, как следствие, целостность кишечного тракта. Идентификация человеческого гомолога INDY помогла бы, возможно, разработать новые препараты, замедляющие старение. Роберт Шмуклер-Рис (Robert Shmookler Reis, University of Arkansas for Medical Sciences, США) рассказал об обнаружении нового белка CRAM-1 во внутриклеточных белковых агрегатах мутантной нематоды, используемой для изучения болезни Хантингтона. Инактивация этого белка приводит к уменьшению размера агрегатов, более позднему развитию паралича и восстановлению хемотаксиса у двух мутантных

нематод, моделей болезней Хантингтона и Альцгеймера. Оказалось, что CRAM-1 вызывает конденсацию олигоубиквитина, что, вероятно, приводит к остановке протеасомной деградации белков и препятствует аутофагии. Фармакологические ингибиторы гомолога данного белка у человека могли бы оказаться полезными при лечении возрастных нейродегенеративных болезней.

Другое перспективное направление геронтологии – изучение генов, продлевающих жизнь модельных организмов. Так, Вера Горбунова (Vera Gorbunova, University of Rochester, США) сообщила, что SIRT-6 – белок, избыточная экспрессия которого продлевает жизнь мышам, играет роль хранителя генома. SIRT-6 способствует репарации повреждений ДНК путем моно-ADP-рибозилирования и активации белка PARP-1. Обнаружен регулятор белка SIRT-6 и показано, что SIRT-6 поддерживает стабильность генома и другими способами. Уильям Опп (Bill Orr, Southern Methodist University, США) рассказал, каким образом редокс-сенсорные функции пероксиредоксинов могут регулировать экспрессию генов долголетия у дрозофилы. PRX-5 контролирует баланс между врожденным иммунитетом и старением. Снижение экспрессии PRX-5 повышает сопротивляемость инфекциям, тогда как избыток PRX-5 приводит к снижению иммунитета при увеличении продолжительности жизни (на 30%) и устойчивости к окислительному стрессу.

Безусловно, незаменимым инструментом при поиске новых генов долголетия является исследование долгожителей и долгоживущих видов животных. Так, в результате полногеномных популяционных исследований Клаудио Франчески (Claudio Franceschi, University of Bolo-

gna UNIBO, Италия) обнаружил протективный аллель APOE (T), носительство которого коррелирует с низким артериальным давлением, низкой вероятностью инсульта и большой продолжительностью жизни. Выявлены также неожиданно благоприятные эффекты мутаций в комплексе I митохондрий, наблюдаемые в отсутствие мутаций в комплексах III и V. В докладе Юшин Су (Yousin Suh, Albert Einstein College of Medicine, США) сообщается о том, что определенные варианты однонуклеотидных полиморфизмов в промоторных участках гена *sirt-1* препятствуют связыванию транскрипционного активатора CTCF и способствуют связыванию репрессора транскрипции ZFR. Это предотвращает активацию *sirt-1* при окислительном стрессе и повышает риск инфаркта миокарда. Ассоциированный с долголетием вариант однонуклеотидных полиморфизмов в энхансерном участке гена *foxo-3* сходным образом усиливает экспрессию этого гена в ответ на окислительный стресс. SKAT-анализ однонуклеотидных полиморфизмов у столетних долгожителей и в контрольных группах показал, что в число первых 25 генов, ассоциированных с долголетием, входят в основном гены, связанные с обнаружением и репарацией двухцепочечных разрывов ДНК.

Результаты анализа геномов и экспрессии генов у млекопитающих представил Вадим Гладышев (Vadim Gladyshev, Harvard Medical School, США). Секвенирование геномов нетипично долгоживущих млекопитающих – голого землекопа (подземный грызун) и ночницы Брандта (летучая мышь) – и последующее сравнение с геномами близкородственных видов позволило выявить ряд генов, ассоциированных с долголетием. Работа этой груп-

пы направлена на сравнение экспрессии генов у видов с низкой и высокой продолжительностью жизни с целью выявления новых генов долголетия. Андрей Селуянов (Andrei Seluanov, University of Rochester, США) сообщил, что высокомолекулярная гиалуроновая кислота защищает голого землекопа от развития рака, в то время как низкомолекулярная гиалуроновая кислота, наоборот, действует как канцероген. Более того, рибосомы голого землекопа способны синтезировать белки с рекордно низким числом ошибок. Джоао Педро де Мегалес (Joao Pedro de Magalhaes, University of Liverpool, Великобритания) поделился некоторыми результатами секвенирования генома гренландского кита – самого долгоживущего млекопитающего, обнаружено только пять генов, подвергнутых недавнему действию отбора, в том числе отвечающих за иммунный ответ.

Мутации и повреждения ДНК играют роль в старении и на уровне отдельных соматических клеток. Ян Вийг (Jan Vijg, Albert Einstein College of Medicine, США) представил новые методики обнаружения и анализа соматических мутаций и эпигенетических изменений, такие, как полное секвенирование генома отдельной клетки и транскрипто-геномика индивидуальной клетки, которая позволяет определить, транскрибируется ли изучаемая мутация или она остается молчащей. Исследования на мышах и дрозофилах, выполненные с использованием этих методик, показали, что количество соматических мутаций и доля молчащих мутаций возрастает с возрастом. Александр Маслов (Alex Maslov, Albert Einstein College of Medicine, США) представил новый метод оценки уровня повреждений ДНК с использованием количественной ПЦР-амплификации протяжен-

ных фрагментов. Обнаружено небольшое возрастное повышение уровня повреждений ДНК в печени, но не в головном мозге лабораторных животных. Другой метод, позволяющий определять соматические структурные вариации ДНК (транслокации, инверсии, дубликации) с помощью высокопроизводительного секвенирования, помог выявить повышение числа таких изменений в печени и головном мозге стареющих мышей, но не в кишечнике или сердце. В результате повреждения ДНК соматические клетки переходят в состояние физиологического старения – необратимой задержки клеточного деления. Джуди Кампизи (Judy Campisi, Buck Institute for Research on Aging, США) представила трансгенную мышь, пригодную для визуализации и уничтожения стареющих клеток, определяемых по избыточной экспрессии p16-INK-4a. Оказалось, что стареющие клетки накапливаются после воздействия ионизирующей радиации или введения доксорубина, способствуют метастазированию опухолей и отвечают за побочные эффекты химиотерапии. В то же время кратковременное (но не постоянное) присутствие стареющих клеток в повреждениях кожи способствует ускорению их заживления путем секреции мощного фактора роста.

В последнее время все большую поддержку получает теория о взаимосвязи генов, эпигенетической регуляции, обмена веществ, кишечной микрофлоры, образа жизни и окружающей среды при определении продолжительности жизни индивида. Так, Клаудио Франчески (Claudio Franceschi, University of Bologna UNIBO, Италия) показал, что профиль метаболизма столетних долгожителей разительно отличается от профиля пожилых людей, но сходен

с профилем молодой популяции. Кроме того, по данным шотган-секвенирования микробиома, в кишечнике столетних долгожителей повышено относительное содержание Proteobacteria родов *Escherichia* и *Ruminococcus*. Дэниел Промислоу (Daniel Promislow, University of Washington, США) представил новую методику изучения метаболома, совмещающую высокочувствительную орбитрэп-масс-спектрометрию с WGCNA-анализом данных для выявления метаболомных модулей коррелирующих метаболитов. Он показал, что ограничение калорийности питания – многократно подтвержденный способ увеличения продолжительности жизни – оказывает сильный эффект не только на уровне отдельных метаболитов у дрозофил, но и на взаимодействия между ними. Алексей Москалев (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Московский физико-технический институт, Россия) обсудил механизмы увеличения продолжительности жизни после умеренного стресса, такого, как воздействие ионизирующей радиации (явление гормезиса), открытые на мутантных линиях дрозофил. При этом происходит уничтожение чувствительных клеток, стимуляция клеточного стресс-ответа, активация иммунной системы и ускорение роста организма. Секвенирование РНК показало усиление активности четырех генов (включая *sugarbabe*, *tramtrack* и *fat*) и снижение активности 48 генов, ассоциированных со старением (например, *keap-1* и *relish*), после воздействия низкой дозы γ -излучения.

Изучение процесса старения, учитывая его сложность, невозможно без привлечения компьютерных технологий. Так, Джоао Педро де Мегалес (Joao Pedro de Magalhaes, University of Liverpool, Великобритания) рассказал

про онлайн-базы данных: Digital Aging Atlas (Цифровой атлас старения), Human Aging Genomic Resources (Геномные ресурсы старения человека) и The Naked Mole-Rat Genome Resource (Геномный ресурс голого землекопа). Его коллега по университету, Дэниел Вуттке (Daniel Wuttke, University of Liverpool, Великобритания), представил новую онлайн-платформу с открытым кодом для коллаборации ученых с целью изучения механизмов старения, названную Denigma. Эта платформа основана на машинном обучении по базам данных, массивам данных, а также индивидуально вводимым данным и созданию на их основе модели старения. Система использует онтологии, разложение проблем на подпроблемы и машинную логику.

Насущную необходимость геронтологии представляет поиск надежных биомаркеров старения. Так, Клаудио Франчески (Claudio Franceschi, University of Bologna UNIBO, Италия) сообщил о нескольких биомаркерах биологического возраста, подтвержденных в популяционных исследованиях, таких, как уровни N-гликанов в крови, особенно соотношение NGA2F/NA2F, гиперметилирование локусов *elovl-2* и *fhl-2*, метаболитные сигнатуры крови и мочи и циркулирующая митохондриальная ДНК. Анча Баранова (Исследовательский центр медицинской генетики, Россия; George Mason University, Fairfax VA, США) представила простой, но надежный метод определения стадий различных заболеваний или старения, основанный на профилировании мРНК с помощью олигонуклеотидных микрочипов или неглубокого высокопроизводительного секвенирования и последующем вычислении расстояния полученного профиля от нормы в условных координатах. Данный метод пригоден

для предсказания прогрессии злокачественных опухолей.

Отдельная секция конференции была посвящена биоинженерным подходам к здоровому долголетию. Так, Шэй Сокэр (Shay Soker, Wake Forest School of Medicine, США) сообщил о последних достижениях в выращивании органов в биореакторах. Простые органы – роговица, сосуды, мочевой пузырь – выращиваются сравнительно легко, в то время как сложные – печень, почка, поджелудочная железа – нуждаются в присутствии биокаркасов. Паоло Маккиарини (Каролинский институт, Швеция) представил технологию выращивания неиммуногенных трахей, других органов грудной клетки и их клиническое применение. В результате экспериментов выяснилось, что мезенхимальные стволовые клетки и мононуклеарные лейкоциты в равной степени хорошо подходят для заселения биокаркасов или биоискусственных трехмерных наноматериалов. Кроме того, оказалось, что G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) ускоряет заселение и приживаемость биокаркасов в организме человека, а эритропоэтин снижает долю апоптотных клеток. Грегори Фэй (Greg Fahy, 21st Century Medicine Inc., США) рассказал об успехах и трудностях в витрификации органов. Были разработаны криопротекторные смеси, протоколы перфузии органов этими смесями под высоким давлением и способы быстрой разморозки органов. Тем не менее острой проблемой остаются различия в оптимальной скорости заморозки разных типов клеток и зон органов.

Андре Уотсон (Andre Watson, Ligandal Technology, США) представил коммерческую технологию целевой доставки лекарственных средств и невирусных инструментов редактирования генома

(таких, как CRISPR и TALEN) до отдельных клеток и органелл с помощью нанокапсул. Эффективность этой технологии подтверждена в ряде экспериментов в пробирке и на живых организмах. Ксения Юрьева (Институт стволовых клеток человека, Россия) сообщила о появлении технологий создания искусственных хромосом человека. В настоящее время существуют два подхода: «сверху-вниз», при котором нормальная хромосома освобождается от всех генов, в ней остаются только теломерные и центромерные участки, и «снизу-вверх», когда хромосома синтезируется с нуля. Для размножения и внедрения искусственных хромосом применяется технология микроклеточного переноса, в которой клетки-носители используются для мультпликации хромосом, затем фрагментируются, и полученные фрагменты, несущие по хромосоме, сливаются с клетками-мишенями. Возможности, открываемые селективным редактированием генома и внедрением искусственных хромосом, для продления жизни человека поистине безграничны.

Таким образом, фармакологические и генетические эксперименты на модельных организмах, а также всестороннее изучение долгожителей и долгоживущих видов животных позволяют выявить взаимосвязь генов, эпигенетической регуляции, обмена веществ, кишечной микрофлоры, образа жизни и окружающей среды при определении продолжительности жизни индивида, равно как и обнаружить новые гены, аллели, процессы, метаболиты, штаммы кишечных бактерий и внешние воздействия, влияющие на скорость старения. Прогрессу исследований способствует внедрение новых методик и технологий, таких, как идентификация соматических мута-

ций и количественный подсчет повреждений ДНК в индивидуальных клетках, получение полных профилей метаболитов или определение биологического возраста с помощью биохимических или генетических маркеров. В связи с необычайной сложностью процесса старения и огромным количеством накапливаемых знаний незаменимым становится внедрение и активное использование онлайн-баз данных возрастных изменений, а также онлайн-депозитории геномов долгожителей и долгоживущих видов животных, в том числе и ресурсов с применением искусственного интеллекта. Все эти усилия позволили разработать лекарственные средства, с большой вероятностью способные замедлить старение и находящиеся на стадии доклинических испытаний: никотинамидрибозид, селективные ингибиторы TORC-1 и антитела-блокаторы к рецептору IGF-1. В ближайшем будущем возможно появление новых классов средств против старения, например, подавляющих воспалительные реакции, окислительный стресс и образование белковых конгломератов, активирующих репарацию ДНК, уничтожающих стареющие клетки или даже воздействующих на нейротрансмиссию. Параллельно развиваются биоинженерные подходы к здоровому долголетию – выращивание и трансплантация искусственных органов, адресная доставка лекарственных средств до клеток и органелл, направленное редактирование генома и внедрение искусственных хромосом.

Участники конференции направили во Всемирную организацию здравоохранения обращение о необходимости мониторинга и интеграции данных, связанных с возраст-зависимыми заболеваниями. ●

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 577.112;615.919;579.234

Цитотоксины кобр: структурная организация и антибактериальная активность

П. В. Дубовский, Ю. Н. Уткин*

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

*E-mail: utkin@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 08.04.2014

РЕФЕРАТ Кардиотоксины (цитотоксины, ЦТ) – это выделенные из яда кобр β -структурные белки из 59–61 аминокислотного остатка, антипараллельные цепи которых организованы в виде трех петель. В отличие от нейротоксинов, имеющих такую же пространственную укладку, ЦТ амфифильны. Это обусловлено тем, что окончания их петель сформированы преимущественно гидрофобными аминокислотными остатками, которые окаймляет пояс положительно заряженных остатков лизина и аргинина. Сходным распределением аминокислотных остатков характеризуются линейные (без дисульфидных связей) катионные цитолитические пептиды из ядов других змей и насекомых, которые в настоящее время рассматривают в качестве прототипов соединений, обладающих антибактериальной и противоопухолевой активностью. В представленном обзоре суммированы данные об антибактериальной активности ЦТ и проведено сравнение с активностью линейных пептидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибактериальная активность, липополисахарид, пептидогликан, плазматическая мембрана, трехпетлевые кардиотоксины (цитотоксины), цитолитические катионные пептиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробный пептид; ГАГ – глюкозаминогликаны; КЛ – кардиолипид; ЛПС – липополисахаридный слой; ЛТК – липотейхоевая кислота; РСА – рентгеноструктурный анализ; ФГ – фосфатидилглицерин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЦТ – цитотоксин (кардиотоксин) из яда кобр; ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Цитолитические пептиды входят в состав ядов змей и насекомых. В качестве структурного мотива они содержат протяженные гидрофобные участки, окаймленные положительно заряженными остатками лизина и аргинина [1]. Цитолитические пептиды могут быть линейными [2–7] или содержать дисульфидные связи [8]. В последнем случае они могут быть только β -структурными [9–12] или содержать и β -структурные, и α -спиральные участки [13, 14]. Интерес к цитолитическим пептидам обусловлен тем, что некоторые из них обладают одновременно антибактериальной и антипролиферативной активностью [15–18]. На основе таких пептидов активно конструируют пептиды с улучшенным терапевтическим индексом [19–23]. В этом случае обычно используют принцип комбинирования различных мотивов в одном пептиде – вызывающих слияние мембран, цитолитических и способствующих проникновению в клетку. Однако системному использованию таких

пептидов препятствует их неустойчивость к протеолизу в кровяном русле [24, 25]. Поэтому, на наш взгляд, интерес будут представлять именно пептиды, обладающие компактной структурой, стабилизированной одной или несколькими дисульфидными связями.

К цитотоксинам (кардиотоксинам, ЦТ) относятся трехпетлевые токсины из яда кобр [12, 26–28], вызывающие гибель различных типов клеток вследствие повреждения плазматической мембраны. Исследование механизма взаимодействия ЦТ с модельными липидными мембранами показало, что он зависит от типа токсина, Р или S [29, 30]. К Р-типу относят ЦТ с остатком Pro30, к S-типу – с остатком Ser28 на конце второй петли (*таблица*). Данные о взаимодействии ЦТ с модельными фосфолипидными мембранами свидетельствуют о том, что эти токсины дестабилизируют липидный бислой мембран, содержащих анионные фосфолипиды [30, 31]. Поэтому очевидно, что объектом атаки ЦТ в живой клетке является плазматическая

Кардиотоксины: свойства и конформационные особенности

Вид кобры, <i>Naja</i>	Аббревиатура	Альтернативные названия	Идентификатор ¹	I/II ²	S/P ³	HTL ⁴	Положительный заряд (нейтр. рН)	Метод	PDB-код ⁵
<i>N. mossambica</i>	M1	CTX: IIb, VII1 CT-1	P01467	I	P	3.4	8	ЯМР	2CCX
	M3	CTX VII4 CT-4	P01470	II	S	1.0	10	РСА	1CDT
<i>N. atra</i>	A1	CTX:-1, I CT:-1(CX1)	P60304	II	S	12.5	7	ЯМР	2CDX
	A2	CTX:-2, II CT:1A, -2(CX2)	P01442	II	S	12.9	8	ЯМР	1CRF 1CRE
	A3	CTX:-3, III CT-3	P60301	II	P	11.7	9	ЯМР	2CRT, 2CRS
								ЯМР	1I02
								РСА	1H0J
								РСА	1XT3
	A4	CTX:-4, IV CT:-4	P01443	II	S	12.9	9	ЯМР	1KBT 1KBS
A4b	CTX:-A4b; -T CT: D-1; -5	P07525	II	S	9.8	9	ЯМР	1CHV	
A6	CTX:6, N CT:-6, N	P80245	I	P	9.3	8	РСА	1UG4	
<i>N. oxiana</i>	СТII (ЦTII)	CT-2	P01441	II	P	16.3	10	ЯМР	1CB9, 1CCQ
								ЯМР	1FFJ
	CTI (ЦTI)	CT-1	P01451	II	S	8.9	6	ЯМР	1RL5 1ZAD
<i>N. pallida</i>	Tγ	CTX: гамма CT-1	P01468	I	P	3.4	9	ЯМР	1CXO
								РСА	1TGX

¹Код аминокислотной последовательности в базе данных белковых структур Swiss-Prot (www.uniprot.org).

²Классификация ЦТ на группы I и II в зависимости от наличия в петле I последовательности двух остатков Pro (группа I) или одиночного Pro (группа II).

³ЦТ S- и P-типа в зависимости от наличия в окончании петли II остатков S28 и P30 соответственно.

⁴Для расчета использованы остатки 5–11, 24–37, 46–50 и шкала гидрофобности Kyte-Doolittle, большее значение HTL соответствует большей гидрофобности.

⁵База данных белковых структур PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

мембрана (или мембраны органелл клетки), содержащая такие фосфолипиды. Взаимодействие ЦТ с компонентами поверхностной мембраны эукариотических клеток приводит к нарушению ее барьерных свойств и/или проникновению ЦТ в клетку и взаимодействию с органеллами, что приводит к гибели клетки [32–35]. Предполагается, что для подобного сценария в мембране должен присутствовать анионный гликолипид-сульфатид [36]. С другой стороны, мембраны бактериальных клеток практически полностью состоят из анионных фосфолипидов [37] и, следовательно, должны быть гораздо более уязвимы для ЦТ. Показать, так ли это – задача данного обзора.

Все молекулы ЦТ содержат такие структурные и функциональные мотивы, как мембраносвязываю-

щий мотив и окаймляющий его пояс заряженных остатков, а также кластеры консервативных полярных остатков [12]. Можно ожидать, что эффективность данных мотивов на определенных этапах внедрения ЦТ в бактериальную клетку, а также последовательность их участия в процессе взаимодействия с клеткой будут определять активность токсина. Рассмотрим вначале структурную организацию молекулы ЦТ.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦТ

Структурная организация молекул ЦТ, в исследование которой существенный вклад был внесен сотрудниками Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

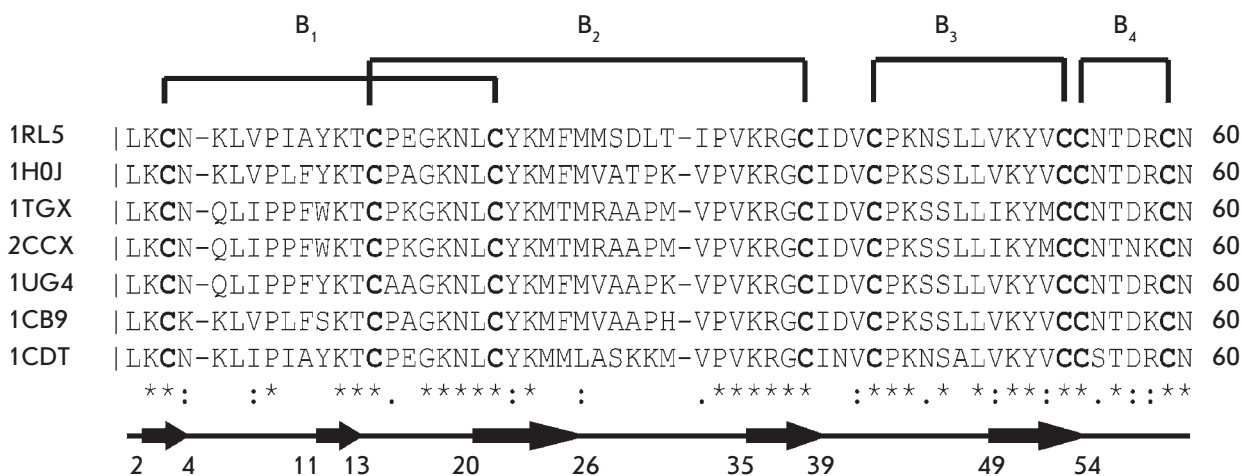


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей (остатки цистеинов набраны жирным шрифтом) ЦТ, пространственная структура которых определена методами ЯМР или рентгеноструктурного анализа (см. таблицу). Код соответствующей структуры в PDB-банке приведен слева. Под последовательностями звездочками, двоеточиями и точками обозначены остатки: консервативные, близкие и более отдаленные по свойствам соответственно. Дисульфидные связи (B₁–B₄) обозначены квадратными скобками над последовательностями. Внизу указана вторичная структура: участки антипараллельных цепей обозначены стрелками, под которыми указаны границы (номера остатков) их формирования

РАН, обсуждалась в ряде работ [30, 38–40] и обзоров [12, 23, 27]. Здесь мы рассмотрим ее кратко. ЦТ характеризуются высоким сходством аминокислотных последовательностей. Выравнивание аминокислотных последовательностей ЦТ, пространственная структура которых была определена методами рентгеновской дифракции или ЯМР, приведено на рис. 1. В таблице указана сопутствующая информация (источник, краткие наименования, заряд этих токсинов и т.д.).

Все ЦТ – это β-структурные белки, имеющие трехпетлевую укладку [41] (рис. 2). Консервативными элементами в их пространственной структуре являются четыре дисульфидные связи и восемь формирующих их остатков цистеина (рис. 1). Следует отметить важную структурообразующую роль остатка Asn60, локализованного в непосредственной близости от последнего из цистеинов, консервативного во всех ЦТ. Боковая цепь данного остатка формирует три водородных связи в гидрофобном ядре молекулы.

Петли ЦТ сформированы тяжами антипараллельной β-структуры (рис. 2). Размеры β-листов: малого (формируемого двумя тяжами петли I) и большого (образованного обоими тяжами петель II и III), а также их закрутка сходны у различных ЦТ. Отличия между структурами различных ЦТ наблюдаются в участках с нерегулярной структурой – в окончаниях петель I и II. В ЦТ группы I (к этой группе относят ЦТ с двумя остатками Pro в оконечности петли I) эта

петля изогнута (рис. 2A) и принимает форму банана (banana-twist) [42]. Это достигается за счет двух остатков Pro в окончании петли I, первый из которых (Pro8) находится в *цис*-конфигурации, и поворота типа VIa (стабилизируется водородными связями: 10 HN...O=C 7 и NH боковой цепи остатка Gln5 с C=O остатка 7). В ЦТ группы II (к этой группе относятся ЦТ с одним остатком Pro8 в оконечности петли I) эта петля более вытянута (рис. 2A).

Интересной особенностью ЦТ является Ω-образная форма окончания петли II (рис. 2A). Методом спектроскопии ЯМР показано, что здесь локализована молекула связанной воды с большим временем жизни в связанном состоянии [43]. Она может формировать до трех водородных связей: с одним из амидных протонов петли II и двумя карбонильными группами полипептидного остова этой части молекулы.

Структура петли III во всех ЦТ наиболее консервативна. Начало ее формируют остатки 40–45 (нумерация приведена для ЦТ из 60 аминокислотных остатков), формирующие кросс-поворот с правой закруткой (рис. 2A). Он соединяет внешние полипептидные цепи трехтяжевого β-слоя. Остатки 46–49 в окончании петли III формируют β-поворот типа I. Остатки 49–54 формируют тяж антипараллельной структуры с остатками 20–26. Интересно отметить, что протяженность этого заключительного тяжа строго одинакова во всех известных структурах ЦТ [12].

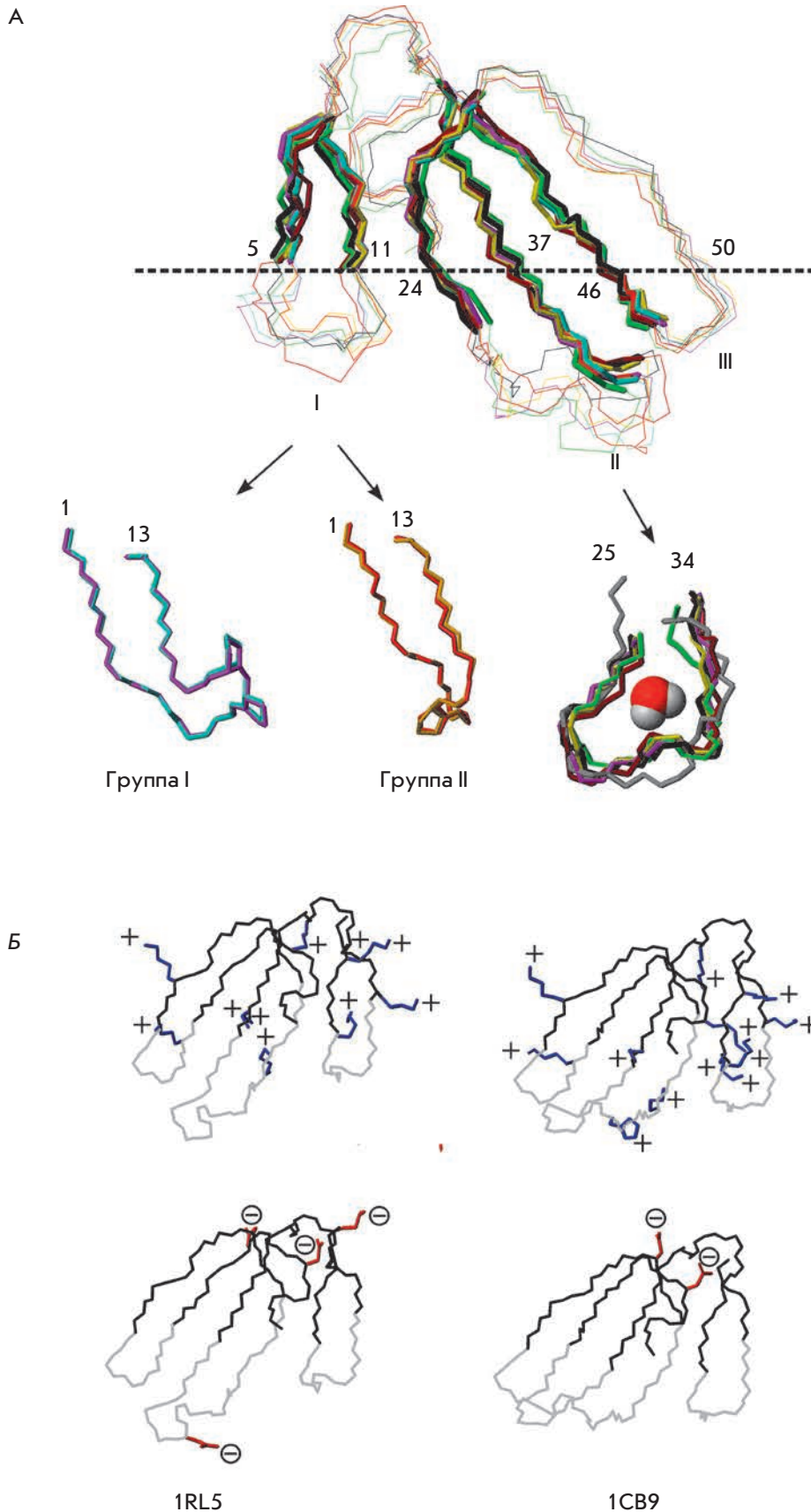


Рис. 2. Детализация пространственной структуры ЦТ. А – суперпозиция структур цитохсинов, перечисленных на рис. 1 (для деталей см. также таблицу), по элементам вторичной структуры (нити антипараллельной β -структуры утолщены). Петли пронумерованы римскими цифрами. Пунктирной линией показана граница раздела мембрана–вода, установленная методом ЯМР, в модельной системе [38]. Рядом с линией приведены номера аминокислотных остатков, которые оказываются на этой границе (по данным [38]). Суперпозиция по остаткам первой и второй петель приведена внизу набора (только для кристаллических структур из набора). Для петли I приведены суперпозиции ЦТ, формирующие группу I (характеризуются наличием двух остатков Pro в оконечности петли) или II (одиночный остаток Pro в оконечности петли). Показаны тяжелые атомы боковой цепи остатков Pro. В центре петли II показана молекула воды (формирование ею водородных связей: детали см. в тексте). Б – распределение положительных (остатки Lys, Arg, His, вверх, концевые группы остатков помечены знаком «+», синий цвет) и отрицательных (остатки Asp, Glu, вниз, концевые группы боковых цепей этих остатков помечены знаком «-» в круге, красный цвет) зарядов на примере структур ЦТ2 *N. oxiana* (слева) и ЦТ1 *N. oxiana* (справа). PDB-код наборов указан снизу (приведена структура № 1 из набора 20 депонированных структур). Остатки полипептидного остова, формирующие мембранный мотив, показаны серым цветом

Окончания петель играют основную роль во взаимодействии ЦТ с детергентными мицеллами и липидными мембранами [38, 44]. Они формируют мембраносвязывающий мотив ЦТ (рис. 2А). Гидрофобность остатков, формирующих этот мотив, может служить основой для классификации ЦТ (таблица, колонка НТЛ) [23], более тонкой, чем предложенное ранее разделение ЦТ на S- и P-типы [29].

В целом положительный заряд молекулы ЦТ варьирует от четырех до 12 [23]. Различие обусловлено изменением соотношения отрицательно заряженных аминокислотных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и положительно заряженных остатков лизина и аргинина (рис. 2Б). Последние опосредуют взаимодействие ЦТ с полианионными гликополимерами клеточной поверхности животных клеток, глюкозаминогликанами (ГАГ) [45]. Распределение зарядов в молекуле ЦТ определяет соответствующую константу взаимодействия [46].

Очевидно, что биологическое действие ЦТ на различные клетки реализуется в результате: 1) взаимодействия с компонентами клеточной оболочки (если таковая имеется) и плазматической мембраны; 2) проникновения внутрь клетки; 3) последующего взаимодействия с клеточными органеллами.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦТ

Яды змей и насекомых издавна рассматривались в качестве источника различных биологически активных соединений [47–55], в том числе и антибактериальных. Указанием на то, что в состав яда входят антибактериальные соединения, служит низкая частота инфицирования ран, вызванных укусами змей [56]. Предполагалось, что такая активность необходима для защиты самих змей от бактерий, которыми могут быть инфицированы поедаемые ими жертвы [57].

Исследование цельных ядов ряда змей выявило их антибактериальную активность [58, 59]. Так, яды некоторых африканских и азиатских кобр (род *Naja*) и некоторых австралийских элапидов (*Notechis scutatus*, *Pseudechis australis*) обладают очень заметным антибактериальным эффектом, особенно в отношении бактерии *Aeromonas hydrophila* [59]. Исключение представляют яды одной азиатской (*N. oxiana*) и одной африканской (*N. melanoleuca*) кобр, не обладающие такой активностью. Наиболее устойчивой к действию всех ядов оказалась грамотрицательная бактерия *Escherichia coli*. Менее устойчивыми были грамотрицательная *Pseudomonas aeruginosa* и грамположительная *Bacillus subtilis*. Наиболее восприимчивыми к ядам оказались грамположительный кокк *Staphylococcus aureus* и грамотрицательная бактерия *A. hydrophila*. Из приведенных данных видно, что

действию яда подвержены как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. В более раннем исследовании [57] было высказано предположение, что антибактериальной активностью обладает оксидаза L-аминокислот, которая содержится в яде и представляет собой белок с молекулярной массой ~140 кДа. Позднее антибактериальную активность обнаружили у ряда оксидаз из ядов различных змей (см., например, [60, 61]).

Исследование антибактериальной активности цельных ядов насекомых и змей в отношении сравнительно устойчивой бактерии *E. coli* выявило возрастание эффективности в ряду: *Crotalus adamanteus* < *Vipera russellii* << *N. naja sputatrix* < *Apis mellifera* (медоносная пчела) [62]. При этом согласно данным электронной микроскопии воздействию подвергается именно плазматическая мембрана. Исследование антибактериальной активности целого ряда ядов змей, скорпионов и пчелы в отношении грамотрицательной бактерии *Burkholderia pseudomallei* показало, что яды змей *C. adamanteus*, *Daboia russellii russellii*, *Agkistrodon halys*, *P. australis*, *Bungarus candidus* и *Pseudechis guttatus* обладают высокой активностью, сравнимой с активностью хлорамфеникола и цефтазидима [63]. Столь высокую активность объясняют присутствием в яде белков, обладающих ферментативной активностью, – оксидазы L-аминокислот и фосфолипазы А2. Считается, что в результате окислительной активности оксидазы L-аминокислот генерируется пероксид водорода, который убивает бактерии. Добавление перехватчиков пероксида водорода, в частности каталазы, устраняло антибактериальную активность фермента [64]. Фосфолипаза А2 расщепляет фосфолипиды, вызывая пермеабиллизацию мембран [65].

Первое сообщение об антибактериальной активности ЦТ появилось в 1968 г. [66]. Сообщалось, что ЦТ, выделенный из яда ошейниковой кобры *Hemachatus haemachatus* (семейство Elapidae), в концентрации более 50 мкг/мл подавлял *S. aureus*. При этом аминокислотная последовательность ЦТ еще не была установлена. Известно было лишь то, что белок имеет молекулярную массу ~7 кДа и содержит четыре дисульфидных связи.

В дальнейшем была получена более детальная информация об антибактериальной активности ЦТ. Так, в частности, установлено, что ЦТ Р4 (аминокислотная последовательность неизвестна) из *N. nigricollis* активен в отношении ряда грамположительных бактерий: *B. subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* [67]. Минимальные ингибирующие концентрации находились в диапазоне 1.6–6.25 мкг/мл. В отношении грамотрицательных бактерий и других микроорганизмов (дрожжей, грибов) данный ЦТ оказался не-

активным. Можно предположить, что мишенью для ЦТ служит бактериальная мембрана, содержащая анионные фосфолипиды в значительных количествах. Многие цитолитические пептиды, такие, как мелиттин [68], латарцины [69, 70], ваприны [71, 72], кателецидины [73], способны разрушать мембраны в сходном диапазоне концентраций. Другой ЦТ, а именно ЦТЗ из *N. atra* (иначе называется АЗ, *таблицца*), проявлял активность в отношении не только грамположительных (*S. aureus*), но и грамотрицательных микроорганизмов (*E. coli*) [74], хотя ранее отмечалось отсутствие активности цельного яда *N. atra* по отношению к *E. coli* [61]. Возможно, эти расхождения объясняются особенностями штаммов *E. coli*, использованных в цитированных работах. Такие различия могут касаться только липополисахаридной оболочки этих бактерий (ее внешней О-антигенной части, состоящей из разветвленных полисахаридов). В работе Чена и соавт. [74] приведены электронные снимки бактерий до и после взаимодействия с ЦТЗ. Видно, что токсин вызывает характерные повреждения плазматической мембраны: выпячивания, пузыри, разрывы и, следовательно, проникает в липополисахаридный слой (ЛПС). Это может происходить за счет замещения ионов Ca^{2+} на фосфатных группах липида А вследствие взаимодействия заряженных боковых цепей остатков лизина токсина с фосфатными группами липида А ЛПС и вызванным этим разрыхлением слоя [75]. Альтернативным механизмом проникновения антимикробных пептидов через ЛПС является «саморегулируемый захват» (self-promoted uptake), характерный для линейных (без дисульфидных связей) АМП, например, цекропинов [76, 77]. Связывание этих пептидов с ЛПС способствует их проникновению к плазматическим мембранам и увеличивает способность пермеабиллизировать мембраны. В случае ЦТЗ какая-то часть молекул остается связанной с ЛПС, обеспечивая другой части прохождение к плазматической мембране. Это показано в опытах с вытеканием флуоресцентного красителя из липосом, сформированных из фосфолипидов, состав которых соответствовал составу фосфолипидов плазматической мембраны изучаемых бактерий [78]. Предварительная инкубация ЦТЗ с ЛПС уменьшала вытекание красителя. Таким образом, клеточная стенка грамотрицательных бактерий является главным препятствием для поступления ЦТ к плазматической мембране. Высокая доля анионных фосфолипидов в плазматической мембране способствует ее разрушению молекулами ЦТ. С плазматической мембраной связаны важные клеточные функции, такие, как дыхание, транспорт, осморегуляция, синтез липидов и другие, а нарушение ее целостности приводит к гибели клетки [74, 78].

Взаимодействие ЦТЗ с оболочкой грамположительных бактерий (в основном с липотейхоевой кислотой (ЛТК), не имеющей полисахаридной части) также наблюдали в работе Чена и соавт. [74]. Предварительная инкубация ЦТЗ с ЛТК уменьшала вытекание красителя из липосом, сформированных из анионных фосфолипидов (фосфатидилглицерин (ФГ): кардиолипин (КЛ), 6 : 4), имитирующих плазматическую мембрану *B. subtilis*. Эффективная концентрация ЦТЗ (при которой происходит гибель 50% бактерий) приблизительно на порядок меньше (~0.9 мкМ), чем при действии этого токсина на *E. coli*. Это свидетельствует, вероятно, о том, что большая часть молекул ЦТЗ не связана с плазматической мембраной этих бактерий, а находится в водном растворе и/или на внешней мембране (ЛПС), которая представляет серьезную преграду для молекул ЦТ. Таким образом, молекулы ЦТ являются слишком большими и конформационно-жесткими для преодоления этого барьера.

Как обсуждалось выше, антибактериальное действие ЦТ могло быть обусловлено их мембранной активностью. Для оценки механизма разрушающего действия ЦТ на мембраны Као и соавт. [79] анализировали взаимодействие ЦТЗ *N. atra* и токсина гамма *N. nigricollis* с модельными мембранами *E. coli* (фосфатидилэтаноламин (ФЭ)/ФГ, 75/25 моль/моль) и *S. aureus* (ФГ/КЛ, 60/40 моль/моль). Токсин гамма с одинаковой эффективностью разрушал как везикулы ФЭ/ФГ, так и ФГ/КЛ. При этом ЦТЗ был более эффективен в отношении везикул ФГ/КЛ. Фузогенная активность токсинов коррелировала с их способностью разрушать мембраны. Так, ЦТЗ, в отличие от токсина гамма, вызывал более сильное слияние мембран с повышенным содержанием кардиолипина. Приведенные данные свидетельствуют о взаимосвязи фузогенной и антибактериальной активности ЦТ.

Следует отметить попытки создания на основе аминокислотных последовательностей ЦТ антимикробных пептидов меньшего размера, но более активных, чем у исходного пептида. Ранее сообщалось, что пептиды длиной 7–12 остатков из петли I ЦТ4 *N. mossambica* обладают токсичностью *in vivo*, хотя и меньшей, чем у исходного токсина [80]. 14-членный циклический (с одной дисульфидной связью) пептид L1AD3 с аминокислотной последовательностью петли I из ЦТЗ *N. atra* в микромолярных концентрациях способен вызывать апоптоз лейкозных Т-клеток [81, 82]. В водном растворе пептид имеет конформацию β -шпильки, как и соответствующий фрагмент в составе исходного ЦТ. Хотя об антибактериальной активности этих коротких аналогов не сообщается, можно предположить, что β -структурный аналог обладает такой активностью. Действительно, имеется ряд β -структурных антимикробных пептидов с одной

дисульфидной связью, обладающих широким спектром активности (например, [83]). Компактность этих катионных пептидов позволяет им проникать через ЛПС грамотрицательных бактерий и дестабилизировать плазматическую мембрану за счет благоприятного баланса заряд/гидрофобность. Мы полагаем, что после появления интереса к антибактериальной активности ЦТ конструирование антимикробных пептидов на основе их аминокислотных последовательностей не заставит себя долго ждать.

Интересно отметить, что с использованием компьютерных методов анализа установлена эволюционная взаимосвязь между токсинами животных ядов и антибактериальными белками [84]. Вполне вероятно, что токсины животных в ходе эволюции сохранили антибактериальные функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибактериальная активность ЦТ широко варьирует у различных представителей этого семейства пептидов. Из представленных в данном обзоре данных ясно, что в проявлении активности пептида исключительно важную роль играет проникновение через

слой пептидогликана, липосахарида бактерий. Это подтверждается недавним исследованием сравнительной активности пяти различных ЦТ в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [85], показавшим, что активность определяется аминокислотными остатками, не принадлежащими мембраносвязывающему мотиву ЦТ. Вероятно, понять закономерности взаимодействия ЦТ, пространственная структура которых определяется обилием дисульфидных связей, с полимерами, формирующими внешнюю мембрану и пептидогликановый слой бактерий, окажется проще, чем подвижных линейных пептидов, в которых дисульфидных связей нет. Мы полагаем, что следующим этапом будет создание пептидов на основе аминокислотной последовательности ЦТ. Определенные шаги в этом направлении уже сделаны, а один из пептидов L1AD3 [81, 82] может использоваться в терапии лейкозов. Вероятно, число таких примеров со временем будет увеличиваться. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-02128).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kini R.M., Evans H.J. // *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1989. V. 34. P. 277–286.
- Landon C., Meudal H., Boulanger N., Bulet P., Vovelle F. // *Biopolymers.* 2006. V. 81. P. 92–103.
- Dubovskii P.V., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Chupin V.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. P. 10759–10767.
- Bhattacharjya S., Domadia P.N., Bhunia A., Malladi S., David S.A. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 5864–5874.
- Dubovskii P.V., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Karpunin D.V., Chupin V.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 3525–3533.
- Abbassi F., Lequin O., Piesse C., Goasdoue N., Foulon T., Nicolas P., Ladram A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 16880–16892.
- Legrand B., Laurencin M., Sarkis J., Duval E., Moret L., Hubert J.F., Cohen M., Vie V., Zatyiny-Gaudin C., Henry J., Baudi-Floc'h M., Bondon A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1808. P. 106–116.
- Wang G., Li X., Wang Z. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. D933–937.
- Bauer F., Schweimer K., Kluver E., Conejo-Garcia J.R., Forssmann W.G., Rosch P., Adermann K., Sticht H. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 2470–2479.
- Powers J.P.S., Rozek A., Hancock R.E.W. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1698. P. 239–250.
- Sayed-Ahmad A., Kaznessis Y.N. // *PloS One.* 2009. V. 4. № 3. e4799.
- Konshina A.G., Dubovskii P.V., Efremov R.G. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012. V. 13. P. 570–584.
- Yount N.Y., Kupferwasser D., Spisni A., Dutz S.M., Ramjan Z.H., Sharma S., Waring A.J., Yeaman M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 14972–14977.
- Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Samsonova O.V., Egorova N.S., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 4382–4393.
- Mader J.S., Hoskin D.W. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2006. V. 15. P. 933–946.
- Hoskin D.W., Ramamoorthy A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 357–375.
- Schweizer F. // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. V. 625. P. 190–194.
- Riedl S., Zweytick D., Lohner K. // *Chem. Phys. Lipids.* 2011. V. 164. P. 766–781.
- Fazio M.A., Jouvencal L., Vovelle F., Bulet P., Miranda M.T., Daffre S., Miranda A. // *Biopolymers.* 2007. V. 88. P. 386–400.
- Haney E.F., Hunter H.N., Matsuzaki K., Vogel H.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. P. 1639–1655.
- Feliu L., Oliveras G., Cirac A.D., Besalu E., Roses C., Colomer R., Bardaji E., Pianas M., Puig T. // *Peptides.* 2010. V. 31. P. 2017–2026.
- Fadnes B., Uhlin-Hansen L., Lindin I., Rekdal O. // *BMC Cancer.* 2011. V. 11. P. 116.
- Dubovskii P.V., Konshina A.G., Efremov R.G. // *Curr. Med. Chem.* 2014. V. 21. P. 270–287.
- Nguyen L.T., Chau J.K., Perry N.A., de Boer L., Zaat S.A., Vogel H.J. // *PloS One.* 2010. V. 5. № 9. e12684.
- Verardi R., Traaseth N.J., Shi L., Porcelli F., Monfregola L., De Luca S., Amodeo P., Veglia G., Scaloni A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1808. P. 34–40.
- Dufton M.J., Hider R.C. // *Pharmacol. Ther.* 1988. V. 36. P. 1–40.
- Kumar T.K., Jayaraman G., Lee C.S., Arunkumar A.I., Sivaraman T., Samuel D., Yu C. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. V. 15. P. 431–463.
- Kini R.M., Doley R. // *Toxicol.* 2010. V. 56. P. 855–867.
- Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C., Vyas A.A., Rule G.S., Wu W. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.

30. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Konshina A.G., Utkin Y.N., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biochem. J.* 2005. V. 387. P. 807–815.
31. Dubinnyi M.A., Lesovoy D.M., Dubovskii P.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. // *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2006. V. 29. P. 305–311.
32. Feofanov A.V., Sharonov G.V., Dubinnyi M.A., Astapova M.V., Kudelina I.A., Dubovskii P.V., Rodionov D.I., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2004. V. 69. P. 1148–1157.
33. Feofanov A.V., Sharonov G.V., Astapova M.V., Rodionov D.I., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *Biochem. J.* 2005. V. 390. P. 11–18.
34. Wang C.H., Wu W.G. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 3169–3174.
35. Wu M., Ming W., Tang Y., Zhou S., Kong T., Dong W. // *Am. J. Chin. Med.* 2013. V. 41. P. 643–663.
36. Wu P.L., Chiu C.R., Huang W.N., Wu W.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. P. 1378–1385.
37. Epand R.M., Rotem S., Mor A., Berno B., Epand R.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 14346–14352.
38. Dubovskii P.V., Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 137–149.
39. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2038–2046.
40. Tjong S.C., Chen T.S., Huang W.N., Wu W.G. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 9941–9952.
41. Galat A., Gross G., Drevet P., Sato A., Menez A. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 3207–3225.
42. Chen T.S., Chung F.Y., Tjong S.C., Goh K.S., Huang W.N., Chien K.Y., Wu P.L., Lin H.C., Chen C.J., Wu W.G. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 7414–7426.
43. Dementieva D.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 263. P. 152–162.
44. Dauplais M., Neumann J.M., Pinkasfeld S., Menez A., Roumestand C. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 213–220.
45. Vyas A.A., Pan J.J., Patel H.V., Vyas K.A., Chiang C.M., Sheu Y.C., Hwang J.K., Wu W.G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 9661–9670.
46. Vyas K.A., Patel H.V., Vyas A.A., Wu W.G. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 4527–4534.
47. Pal S.K., Gomes A., Dasgupta S.C., Gomes A. // *Indian J. Exp. Biol.* 2002. V. 40. P. 1353–1358.
48. de Lima D.C., Abreu A.P., de Freitas C.C., Santos D.O., Borges R.O., Dos Santos T.C., Cabral M.R., Rodrigues C.R., Castro H.C. // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2005. V. 2. P. 39–47.
49. Koh D.C., Armugam A., Jeyaseelan K. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 3030–3041.
50. Samy P.R., Gopalakrishnakone P., Thwin M.M., Chow T.K., Bow H., Yap E.H., Thong T.W. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. V. 102. P. 650–659.
51. Gomes A., Bhattacharjee P., Mishra R., Biswas A.K., Dasgupta S.C., Giri B. // *Indian J. Exp. Biol.* 2010. V. 48. P. 93–103.
52. Kapoor V.K. // *Indian J. Exp. Biol.* 2010. V. 48. P. 228–237.
53. King G.F. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011. V. 11. P. 1469–1484.
54. Lazarev V.N., Govorun V.M. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 803–814.
55. Koh C.Y., Kini R.M. // *Toxicol.* 2012. V. 59. № 4. P. 497–506.
56. Talan D.A., Citron D.M., Overturf G.D., Singer B., Froman P., Goldstein E.J. // *J. Infect. Dis.* 1991. V. 164. P. 195–198.
57. Thomas R.G., Pough F.H. // *Toxicol.* 1979. V. 17. P. 221–228.
58. Glaser H.S.R. // *Copeia*. 1948. P. 245–247.
59. Stiles B.G., Sexton F.W., Weinstein S.A. // *Toxicol.* 1991. V. 29. P. 1129–1141.
60. Okubo B.M., Silva O.N., Migliolo L., Gomes D.G., Porto W.F., Batista C.L., Ramos C.S., Holanda H.H., Dias S.C., Franco O.L., Moreno S.E. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e33639.
61. Rima M., Accary C., Haddad K., Sadek R., Hraoui-Bloquet S., Desfontis J.C., Fajloun Z. // *Infect. Disord. Drug. Targets*. 2013. V. 13. P. 337–343.
62. Stocker J.F., Traynor J.R. // *J. Appl. Microbiol.* 1986. V. 61. P. 383–388.
63. Samy P.R., Pachiappan A., Gopalakrishnakone P., Thwin M.M., Hian Y.E., Chow V.T., Bow H., Weng J.T. // *BMC Infect. Dis.* 2006. V. 6. P. 100.
64. Lee M.L., Tan, N.H., Fung S.Y., Sekaran S.D. // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2011. V. 153. P. 237–242.
65. Samy P.R., Gopalakrishnakone P., Ho B., Chow V.T. // *Biochimie*. 2008. V. 90. P. 1372–1388.
66. Aloof-Hirsch S., de Vries A., Berger A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. V. 154. P. 53–60.
67. Mollmann U., Gutsche W., Maltz L., Ovadia M. // *Toxicol.* 1997. V. 35. P. 487–487.
68. Raghuraman H., Chattopadhyay A. // *Biosci. Rep.* 2007. V. 27. P. 189–223.
69. Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 20983–20992.
70. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Dubovskii P.V., Shatursky O.Y., Arseniev A.S., Grishin E.V. // *Rus. J. Bioorgan. Chem.* 2007. V. 33. P. 376–382.
71. Torres A.M., Wong H.Y., Desai M., Moochhala S., Kuchel P.W., Kini R.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 40097–40104.
72. Nair D.G., Fry B.G., Alewood P., Kumar P.P., Kini R.M. // *Biochem. J.* 2007. V. 402. P. 93–104.
73. Wang Y., Hong J., Liu X., Yang H., Liu R., Wu J. Wang A., Lin D., Lai R. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 9. e3217.
74. Chen L.W., Kao P.H., Fu Y.S., Lin S.R., Chang L.S. // *Toxicol.* 2011. V. 58. № 1. P. 46–53.
75. Bhunia A., Domadia P.N., Torres J., Hallock K.J., Ramamoorthy A., Bhattacharjya S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 3883–3895.
76. Piers K.L., Brown M.H., Hancock R.E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 2311–2316.
77. Arcidiacono S., Soares J.W., Meehan A.M., Marek P., Kirby R. // *J. Pept. Sci.* 2009. V. 15. P. 398–403.
78. Chen L.W., Kao P.H., Fu Y.S., Hu W.P., Chang L.S. // *Peptides*. 2011. V. 32. № 8. P. 1755–1763.
79. Kao P.H., Lin S.R., Hu W.P., Chang L.S. // *Toxicol.* 2012. V. 60. P. 367–377.
80. Marchot P., Bougis P.E., Ceard B., van Rietschoten J., Rochat H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 153. P. 642–647.
81. Smith C.A., Hinman C.L. // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2004. V. 18. P. 204–220.
82. Smith C.A., Hinman C.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 432. P. 88–101.
83. Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. P. 6255–6265.
84. Kaplan N., Morporgo N., Linal M. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 369. P. 553–566.
85. Dubovskii P.V., Vorontsova O.V., Utkin Y.N., Arseniev A.S., Efremov R.G., Feofanov A.V. // *Mendeleev Communications*. Submitted.

УДК 612.089:612.014:602.9:577.113.5:575.224

Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий

А. А. Немудрый^{1,2,3,§}, К. Р. Валетдинова^{1,2,3,4,§}, С. П. Медведев^{1,2,3,4}, С. М. Закиян^{1,2,3,4*}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

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

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

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

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

§Эти авторы внесли одинаковый вклад в написание данного обзора.

Поступила в редакцию 03.03.2014

РЕФЕРАТ Детальное изучение геномов растений, животных и человека открывает широчайшие возможности применения полученных знаний в биотехнологии и медицине. Однако только данных о нуклеотидных последовательностях геномов недостаточно для понимания функциональных взаимосвязей отдельных элементов геномов и их роли в формировании фенотипических признаков и патогенезе отдельных заболеваний. В постгеномную эпоху активно развиваются методы, позволяющие манипулировать с ДНК в геномах, а также визуализировать и управлять экспрессией генов и работой регуляторных элементов. Тем не менее далеко не все методы отвечают высоким требованиям к их эффективности, безопасности и доступности для широкого круга исследователей. В последние несколько лет появились новейшие методы редактирования геномов – это системы TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9. Эти появившиеся относительно недавно системы уже зарекомендовали себя как эффективные и надежные инструменты геномной инженерии. Данный обзор в основном посвящен применению указанных систем для редактирования геномов основных модельных объектов современной биологии, а также для функционального скрининга геномов, создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека, изучения эпигеномов и визуализации клеточных процессов. Кроме того, рассмотрены основные методы конструирования подобных систем, проанализировано их действие, обсуждаются некоторые проблемы, которые ожидают исследователей при применении этих инструментов редактирования геномов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА TALEN, CRISPR/Cas9, редактирование генома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases); CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9; PAM – мотив, прилежащий к протоспейсеру (Protospacer Adjacent Motive); sgRNA (single guide RNA); crRNA (CRISPR RNA) – CRISPR РНК; tracrRNA – транскрибирующая CRISPR РНК; SpCas9 – Cas9 *Streptococcus pyogenes*; pre-crRNA (poly-spacer precursor crRNA) – полиспейсерный предшественник CRISPR РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая инженерия возникла в 1972 году в лаборатории Пола Берга как технология рекомбинантных ДНК, когда ученые объединили геном кишечной палочки с генами бактериофага и вируса SV40. С того времени эта наука достигла колоссальных успехов, были открыты и детально изучены молекулярно-генетические механизмы и явления, которые теперь можно воспроизводить *in vitro*. Исследования в об-

ласти молекулярной генетики и биохимии бактерий и вирусов позволили разработать методы манипуляции с ДНК, создать различные векторные системы и способы их доставки в клетку. Все это позволило получить не только трансгенные микроорганизмы, но и генетически модифицированные растения и животные. Бурное развитие получила прикладная область генной инженерии, дав толчок прогрессу в селекции и биотехнологии. Однако традиционная

стратегия генной инженерии имеет ряд недостатков и ограничений, одно из которых – сложность манипуляции с большими геномами животных и человека.

С 1990 по 2003 год в рамках Международного проекта «Геном человека» была определена последовательность нуклеотидов ядерной ДНК человека и идентифицировано около 20.5 тысяч генов. Аналогичные проекты осуществляются и в настоящее время, расшифрованы нуклеотидные последовательности геномов всех основных модельных биологических объектов – кишечной палочки, нематоды, дрозофилы, мыши и др. Однако эти проекты позволяют получить данные лишь о последовательности нуклеотидов в ДНК, но не дают какой-либо информации о том, как функционируют отдельные элементы генома, как они связаны между собой в целостную систему. Понимание функциональных взаимоотношений в геноме человека позволит не только выявить причинно-следственные связи в патологии наследственных, а также многофакторных заболеваний, но и найти мишени для их терапии.

В 2003 году Национальный исследовательский институт генома человека организовал новый международный проект ENCODE (Encyclopedia Of DNA Elements), целью которого стало объединение усилий ученых с целью получения полного списка функциональных элементов генома человека, включая элементы, которые действуют на уровне белков и РНК, а также регуляторные элементы, контролирующие фундаментальные генетические процессы (транскрипцию, трансляцию и репликацию). Для установления подобных функциональных взаимоотношений используют две стратегии: выключение гена (нокаут или нокдаун) и усиление работы гена либо его эктопическую экспрессию. Традиционные методы – трансгенез с использованием гомологичной рекомбинации у мышей [1], а также применение различных вирусных, в том числе лентивирусных векторов, не только дороги и довольно трудоемки, они не позволяют внести точные изменения в строго определенный локус генома.

В настоящий момент в распоряжении ученых появилось несколько инструментов, которые позволяют решать задачи высокоточного редактирования генома растений, животных и человека.

Еще в 1996 году было впервые показано, что белковый домен типа «цинковые пальцы», соединенный с FokI-эндонуклеазным доменом, действует как сайт-специфическая нуклеаза, разрезая ДНК *in vitro* в строго определенных участках [2]. Такой химерный белок имеет модульную структуру, поскольку каждый домен «цинковые пальцы» узнает один триплет нуклеотидов (Zinc-finger Nuclease, ZFN). Этот метод стал основой редактирования культиви-

руемых клеток, включая плюрипотентные стволовые клетки, и модельных животных и растений [3–8]. Однако технология, основанная на ZFN, имеет ряд недостатков, включая сложность и высокую стоимость конструирования белковых доменов для каждого конкретного локуса генома, вероятность неточного разрезания ДНК-мишени по причине одонуклеотидных замен или неправильного взаимодействия между доменами. Поэтому продолжались активные поиски новых методов редактирования генома. В последние годы эти поиски привели к созданию новых инструментов редактирования геномов – системы TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases; эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats; короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга). Эти системы отличаются относительной простотой конструирования и высокой эффективностью работы в клетках человека, животных и растений. Такие системы, активно применяемые для различных манипуляций с геномами, позволяют решать сложные задачи, включая получение мутантных и трансгенных растений и животных, создание и исследование моделей заболеваний на основе культивируемых плюрипотентных клеток человека. Кроме того, химерные белки на основе ДНК-связывающих доменов TALE и инактивированной нуклеазы Cas9 использовали в экспериментах по регуляции транскрипции генов, для изучения эпигеномов и поведения хромосомных локусов в клеточном цикле.

В представленном обзоре подробно описаны возможности конструирования, применения и анализа действия TALEN и CRISPR/Cas9 на примере различных модельных систем, а также сложности и проблемы, связанные с использованием данных инструментов редактирования геномов.

ЕСТЕСТВЕННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ TALE И CRISPR/Cas КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ИНСТРУМЕНТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ЭУКАРИОТ

TALEN

В 2011 году методы высокоточного редактирования геномов, среди которых была и система TALEN, названы журналом *Nature Methods* методом года [9]. История разработки этой системы связана с изучением бактерий рода *Xanthomonas*. Эти бактерии являются патогенами таких культурных растений, как рис, перец, томат, они наносят экономически значимый вред сельскому хозяйству, что стало причиной их тщательного изучения. Оказалось, что бакте-

рии секретируют в цитоплазму растительных клеток эффекторный белок (Transcription Activator-Like Effectors, TALE), которые влияют на процессы в растительной клетке и увеличивают ее восприимчивость к патогену. При дальнейшем изучении механизмов действия эффекторных белков было обнаружено, что они способны связываться с ДНК и активировать экспрессию своих генов-мишеней, имитируя факторы транскрипции эукариот.

Белки TALE состоят из центрального домена, ответственного за связывание ДНК, сигнала ядерной локализации и домена, активирующего транскрипцию целевого гена [10]. Впервые способность этих белков связываться с ДНК была описана в 2007 году [11], а всего через год двумя группами ученых был расшифрован код узнавания целевой последовательности ДНК белками TALE [12, 13]. Показано, что ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, каждый из которых связывается с одним нуклеотидом в целевой нуклеотидной последовательности. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 34 аминокислотных остатков, из которых два, расположенные в позициях 12 и 13, высоко вариабельные (Repeat Variable Diresidue, RVD), и именно они отвечают за узнавание определенного нуклеотида. Этот код является вырожденным, некоторые RVD могут связываться с несколькими нуклеотидами с разной эффективностью. При этом перед 5'-концом последовательности, с которой связываются мономеры TALE, в целевой молекуле ДНК всегда находится один и тот же нуклеотид – тимидин, влияющий на эффективность связывания [14]. Последний тандемный повтор, связывающий нуклеотид на 3'-конце сайта узнавания, состоит из 20 аминокислотных остатков, поэтому он назван полуповтором.

После расшифровки кода узнавания ДНК белками TALE, который привлек внимание ученых всего мира благодаря своей простоте (один мономер – один нуклеотид), были проведены первые работы по созданию химерных нуклеаз TALENs. С этой целью последовательность, кодирующая ДНК-связывающий домен TALE, встроили в плазмидный вектор, использованный ранее при создании ZFN [15]. В результате были получены генетические конструкции, экспрессирующие искусственные химерные нуклеазы, которые содержат ДНК-связывающий домен и каталитический домен эндонуклеазы рестрикции FokI. Данная система позволяет, комбинируя мономеры ДНК-связывающего домена с разными RVD, создать искусственные нуклеазы, мишенью которых будет любая нуклеотидная последовательность. В большинстве работ используют мономеры, содержащие RVD Asn и Ile (NI), Asn и Gly (NG), два Asn (NN), His и Asp (HD), для связывания нуклеотидов А, Т, G, С соответ-

ственно. При этом RVD NN может связывать как G, так и A. В ряде работ показано, что использование мономеров NH или NK для более специфичного связывания гуанина снижает риск нецелевых эффектов [16, 17]. Показано, что первый аминокислотный остаток в RVD (H или N) не участвует непосредственно в связывании нуклеотида, а отвечает за стабилизацию пространственной конформации. Второй аминокислотный остаток взаимодействует с нуклеотидом, при этом природа этого взаимодействия различна: D и N образуют водородные связи с азотистыми основаниями, а I и G связываются с целевым нуклеотидом за счет сил Ван-дер-Ваальса [18].

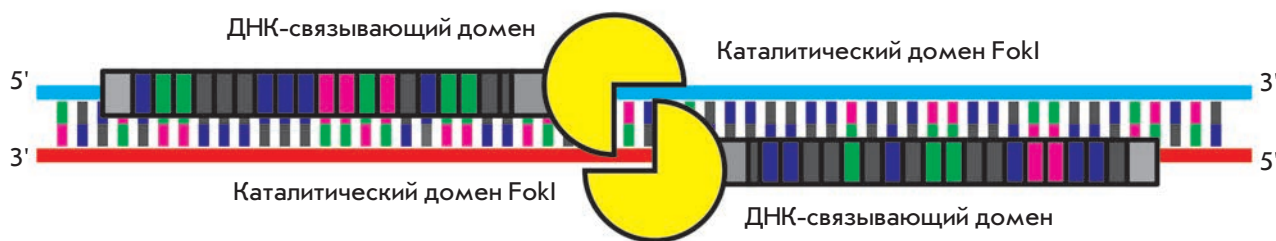
Искусственный ДНК-связывающий домен встраивают в генетическую конструкцию, содержащую сигнал ядерной локализации, полуповтор, N-концевой домен и каталитический домен FokI. Целевые сайты для искусственных нуклеаз выбирают таким образом, чтобы они находились на разных цепях ДНК и были разделены небольшим участком (12–25 п.н.) – спейсерной последовательностью. При попадании в ядро искусственные нуклеазы связываются с целевыми сайтами, в результате чего расположенные на C-концах химерного белка домены FokI димеризуются и вносят двухцепочечный разрыв в спейсерную последовательность (рис. 1).

Теоретически с помощью искусственных нуклеаз TALENs двухцепочечный разрыв можно внести в любой участок генома, с известными сайтами узнавания ДНК-связывающих доменов. Единственное ограничение по выбору сайтов нуклеаз TALEN заключается в необходимости присутствия T перед 5'-концом целевой последовательности. Тем не менее, варьируя длину спейсерной последовательности, в подавляющем большинстве случаев можно осуществить выбор сайтов. Показано, что остаток W232 в составе N-концевой области ДНК-связывающего домена взаимодействует с 5'-T, влияя на эффективность связывания TALEN с целевым сайтом [19]. Однако и это ограничение удается преодолеть в результате селекции мутантных вариантов N-концевого домена TALEN, способных связываться с A, G или C [14].

CRISPR/Cas

Примерно через два года после открытия системы химерных белков TALEN получила развитие и стала активно применяться другая система редактирования геномов – CRISPR, элементами которой являются некодирующие РНК и белки Cas (CRISPR-associated). В отличие от химерных белков TALENs, узнавание системой CRISPR/Cas осуществляется за счет комплементарного взаимодействия между некодирующей РНК и ДНК целевых сайтов. При этом образуется комплекс из некодирующих РНК и бел-

Целевой локус генома



Пара химерных белков TALEN

Код узнавания белковыми доменами нуклеотидов

NI = A

NG = T

NN = G

HD = C

Рис. 1. Схема внесения двунитового разрыва с помощью химерных белков TALEN. Один мономер ДНК-связывающего домена белка узнает один нуклеотид целевой последовательности ДНК. За связывание отвечают два аминокислотных остатка в мономере, приведен код узнавания (аминокислотные остатки в однобуквенных обозначениях). Сайты узнавания расположены на разных цепях ДНК на расстоянии, достаточном для димеризации каталитических доменов FokI. В виде димера FokI вносит двунитовой разрыв в ДНК

ков Cas, которые обладают нуклеазной активностью. Еще в 1987 году в некоторых бактериальных генах были обнаружены таинственные повторы [20], функции которых в течение почти 20 лет оставались неизвестными. Секвенирование бактериальных геномов позволило обнаружить в геноме многих микроорганизмов аналогичные нуклеотидные последовательности, обладающие характерной структурой: короткие участки уникальной ДНК – спейсеры – отделены друг от друга короткими палиндромными повторами (рис. 2). Благодаря этой особенности они и получили свое название – CRISPR. Кроме того, такие CRISPR-кассеты находятся в непосредственной близости от *cas*-генов (CRISPR-associated – ассоциированные с CRISPR), белковые продукты которых обладают хеликазной и нуклеазной активностью [21]. В 2005 году три независимые группы биоинформатиков сообщили о том, что спейсерная ДНК зачастую гомологична ДНК многих фагов и плазмид [22–24]. А в 2007 году было показано, что клетки *Streptococcus thermophilus*, несущие в локусе CRISPR спейсер, комплементарный участку геномной ДНК бактериофага, становятся устойчивыми к этому фагу [25]. Таким образом, стало очевидным, что CRISPR/Cas-система – это уникальный механизм, обеспечивающий защиту микроорганизмов от проникновения чужеродной ДНК и действующий, наряду с системой рестрикции-модификации, как ограничитель горизонтального переноса генетической информации.

CRISPR-системы широко распространены среди прокариот: они обнаружены у 87% архей и 48% эубактерий [26]. Поэтому у разных видов широко варьирует как количество самих CRISPR-кассет в геноме (1–18), так и количество (в среднем 60) и величина повторов (в среднем 23–37 п.н.), а также число и размер спейсеров (17–84 п.н.). При этом длина повторов и спейсеров внутри одной кассеты неизменна, а последовательности повторов практически идентичны [27].

Механизм защиты включает три основных стадии (рис. 2). На первой стадии – адаптации – небольшой фрагмент чужеродной ДНК, проникшей в бактериальную клетку, встраивается в CRISPR-локус генома хозяина, формируя новый спейсер. В вирусном геноме этот фрагмент присутствует в качестве протоспейсера, комплементарного спейсеру и фланкированного короткой (2–5 п.н.) консервативной последовательностью, называемой PAM (Protospacer Adjacent Motif; мотив, прилежащий к протоспейсеру) [28, 29]. Новый спейсер всегда встраивается со стороны АТ-богатой лидерной последовательности, находящейся перед CRISPR-кассетой, в ней же находятся промоторные элементы и сайты посадки регуляторных белков [30, 31]. По всей видимости, именно таким образом формируются мишени большинства CRISPR/Cas-систем.

На второй стадии – транскрипции – весь CRISPR-локус транскрибируется в длинную *pre-crRNA*

(poly-spacer precursor crRNA; полиспейсерный предшественник CRISPR РНК) (рис. 2). Процессинг незрелого транскрипта в зрелые crRNA в большинстве CRISPR/Cas-систем осуществляет эндонуклеаза Cas6 [32–36]. Короткие crRNA (CRISPR РНК) длиной 39–45 нуклеотидов содержат одну спейсерную последовательность, а на концах находятся повторы, которые участвуют в образовании структуры стержень–петля: восемь последних нуклеотидов повтора с гидроксильной группой на 5'-конце образуют стержень, а шпильчатая структура с 2',3'-циклическим фосфатом формирует петлю на 3'-конце [37, 38].

Третья стадия – интерференция чужеродной ДНК или РНК – обеспечивается за счет взаимодействия crRNA и комплекса Cas-белков; crRNA комплементарно узнает последовательность протоспейсера, а Cas-белки обеспечивают ее разрушение (рис. 2).

Для деградации ДНК-мишени эффекторным комплексом необходимо, чтобы не возникали комплементарные взаимодействия между нуклеотидами crRNA и ДНК-мишени в позициях –2, –3, –4 (если за +1 принять первое основание протоспейсера) [39]. По-видимому, комплементарные взаимодействия crRNA и ДНК-мишени по этим позициям нарушают образование эффекторного комплекса, что предотвращает разрезание геномной ДНК и ее последующую деградацию.

Длительная коэволюция вирусов и их хозяев привела к появлению у вирусов защитных механизмов против CRISPR-интерференции [40], что объясняет большое разнообразие CRISPR/Cas-систем у бактерий и архей. Биоинформатические исследования подразделяют все CRISPR/Cas-системы на три основных типа (I–III) и, по меньшей мере, на 10 подтипов [21, 27, 41]. Среди них в геномной инженерии в настоящее время наиболее активно используется CRISPR/Cas-система типа II-A, выделенная из патогена *S. pyogenes*. У этой бактерии обнаружен минимальный набор генов *cas* [27, 41]. Один полифункциональный белок Cas9 осуществляет и процессинг pre-crRNA, и интерференцию чужеродной ДНК [42]. Процессинг crRNA зависит также от малой некодирующей РНК – tracrRNA (trans-activating crRNA; трансактивирующая crРНК). Молекулы tracrRNA комплементарно связываются с последовательностями повторов в pre-crRNA, формируя дуплекс, а одна из рибонуклеаз клетки-хозяина – РНКаза III, в присутствии Cas9 разрезает дуплекс с образованием зрелой crRNA, которая содержит 20-нуклеотидную спейсерную последовательность на 5'-конце. Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в целевой locus в присутствии ионов Mg^{2+} , причем нуклеазный домен HNH этого фермента разрезает нить ДНК,

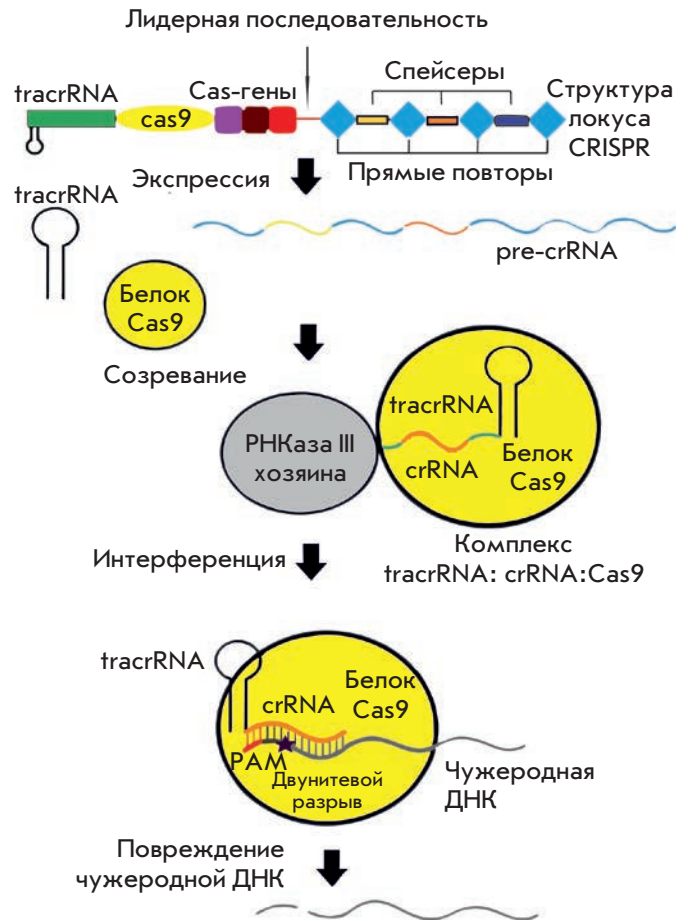


Рис. 2. Механизм действия CRISPR/Cas9 в клетках бактерий (описание в тексте статьи)

комплементарную crRNA, а RuvC-домен режет не-комплементарную нить [43]. ДНК-мишень для Cas9 *S. pyogenes* должна непременно содержать 5'-NGG-3' PAM [43, 44], через три нуклеотида от которого и происходит разрезание. У *S. thermophilus* и *Neisseria meningitidis* мишени для Cas9 типа II имеют другой консенсус – 5'-NGGNG-3' и 5'-NNNNGATT-3' соответственно.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ TALENs и CRISPR/Cas9

Общая стратегия геномной инженерии с помощью сайт-специфических нуклеаз включает четыре основных этапа (рис. 3):

- Выбор целевой нуклеотидной последовательности в геноме.
- Создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень.
- Доставка этой конструкции в клеточное ядро.
- Анализ полученных мутаций.

Биоинформатический анализ

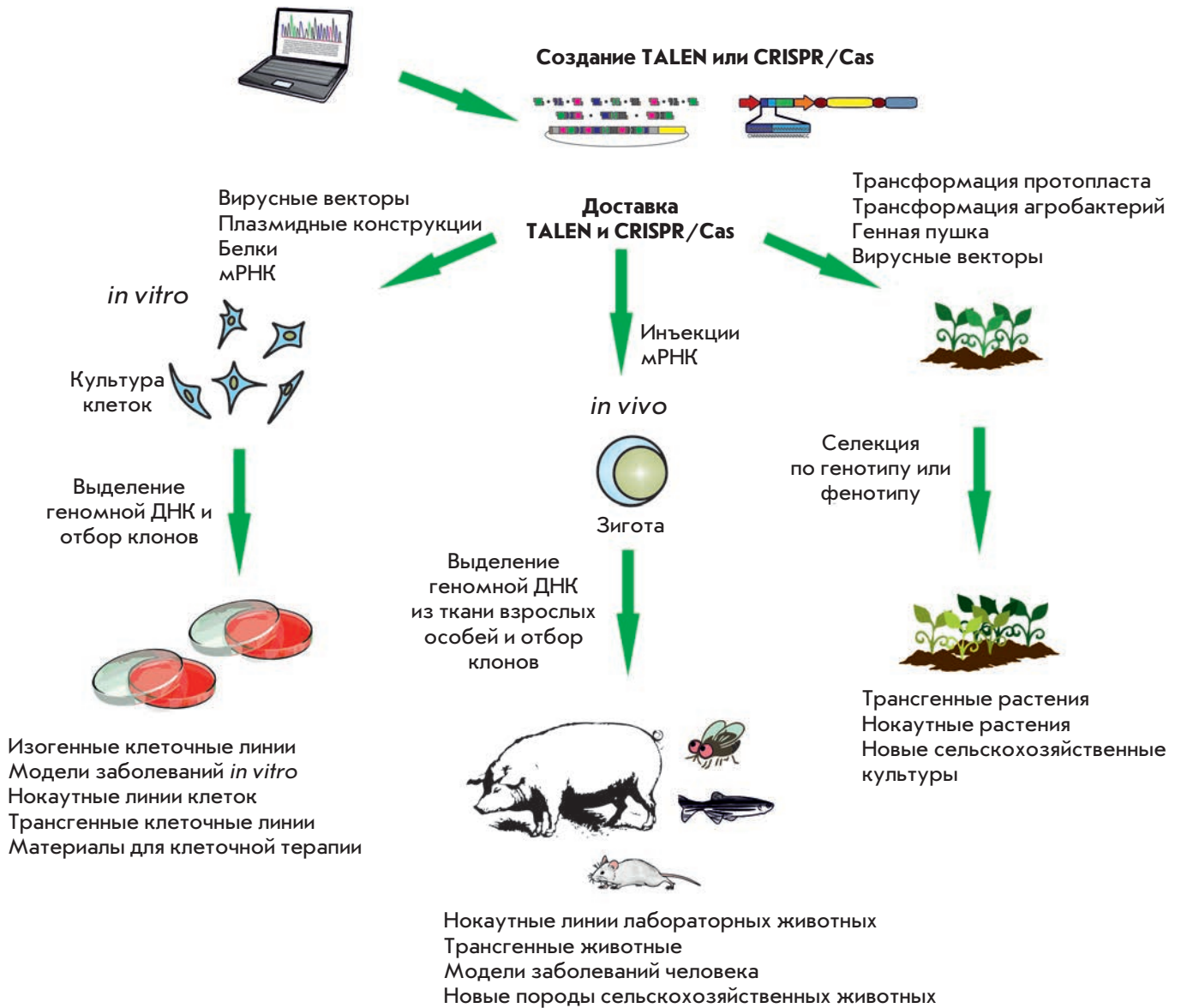


Рис. 3. Общая схема стратегии применения систем TALEN и CRISPR/Cas в геномной инженерии

Выбор целевой нуклеотидной последовательности в геноме

Важным моментом при работе с системами TALENs и CRISPR/Cas9 является тщательный подбор сайтов для специфичного внесения двухцепочечного разрыва. Необходимость предварительного биоинформатического анализа объясняется возможностью нецелевых эффектов – внесения неспецифичных двухцепочечных разрывов в геном. При выборе нужных сайтов следует избегать участков повторенных последовательностей, а также участков,

имеющих высокую гомологию с другими районами генома.

Нецелевые эффекты при использовании системы химерных белков TALENs возникают по нескольким причинам. Во-первых, это различия в эффективности связывания RVD и специфических нуклеотидов. Мономеры HD и NN образуют сильные водородные связи с нуклеотидами, в то время как NG и NI – слабые. Это обуславливает возможное связывание ДНК-узнающего домена с сайтами, отличающимися на несколько нуклеотидов от целевых. Во-вторых, из-за

вырожденности кода связывания нуклеотидов мономерами возможно, например, взаимодействие NG и A. В-третьих, возможна димеризация доменов FokI двух нуклеаз с одинаковыми ДНК-связывающими доменами (образование гомодимеров). Этот вопрос решен в ряде работ благодаря получению TALENs, которые содержат домены FokI, работающие в качестве облигатных гетеродимеров. И наконец, возможные нецелевые эффекты могут возникать в результате того, что размер спейсерной ДНК между сайтами узнавания нуклеаз не фиксирован. Это свойство делает возможным внесение двухцепочечных разрывов при связывании нуклеаз с нецелевыми сайтами, расположенными на расстоянии, достаточном для димеризации доменов FokI [45].

Поскольку нуклеаза Cas9 *S. pyogenes* нуждается в обязательном присутствии PAM с консенсусом 5'-NGG-3', то это хоть и не значительно, но ограничивает выбор мишени. В частности, в геноме человека целевые сайты расположены через каждые 8–12 п.н. [46, 47]. Один из основных недостатков системы CRISPR/Cas9 – сравнительно высокая вероятность возникновения нецелевых мутаций. В ряде работ, выполненных *in vitro* [43], на бактериях [48] и на клетках человека [46], показано, что некоторые однонуклеотидные замены в 20-нуклеотидном спейсерном участке sgRNA (single guide RNA) могут привести к существенному снижению активности CRISPR/Cas9, особенно если эти замены локализованы в последних 10–12 нуклеотидах 3'-конца данного района sgRNA [49]. В то же время замены на 5'-конце sgRNA практически не влияют на функционирование системы [43, 46, 48]. Однако известны случаи, когда некоторые одно- и динуклеотидные замены на 3'-конце sgRNA не влияют на активность системы CRISPR/Cas9 и, наоборот, препятствуют ее действию, если находятся на 5'-конце [49]. В целом же, нецелевой эффект определяется положением замен – 8–12 п.н. на 3'-конце направляющей последовательности менее важны для Cas9, чем нуклеотиды 5'-конца; количеством замен, которых не должно быть больше трех; особенностями самого сайта-мишени; концентрацией вводимых Cas9 и sgRNA [46–49]. Преодолеть указанные недостатки позволит поиск и разработка методов, основанных на использовании ортологов Cas9, для активности которых необходимы PAM, имеющие более сложную консенсусную последовательность. Так, например, CRISPR/Cas типа II *N. meningitidis* распознает PAM с консенсусом 5'-NNNNGATT-3', что, безусловно, ограничивает возможности выбора мишени, однако может повысить специфичность.

С целью повышения специфичности редактирования генома с помощью CRISPR/Cas-системы также используют две никазы Cas9 с парой sgRNA

[50, 51] по аналогии с парами ZFNs и TALENs, которые вносят разрывы в ДНК только при действии двух независимых белков с доменами FokI. Мутации в одном из каталитически активных доменов (D10A в HNH и H840A в RuvC) превращают нуклеазу Cas9 в ДНК-никазу [43, 46, 52]. Если разрезание обеих цепей ДНК парой никаза Cas9 приводит к образованию сайт-специфических двухцепочечных разрывов, которые репарируются с помощью негомологичного сшивания концов ДНК (NHEJ – non-homologous end joining), то отдельные одноцепочечные повреждения репарируются преимущественно посредством высокоточной эксцизии оснований (BER – base excision repair) [53]. Показано, что применение двух никаз Cas9 с парой sgRNA обеспечивает значительное снижение образования нецелевых мутаций, при этом выход целевых мутаций в целом соответствует выходу при использовании нуклеазы [50, 51].

Перечисленные свойства узнавания целевых сайтов системами CRISPR/Cas9 и TALENs были учтены при разработке компьютерных алгоритмов поиска таких сайтов. В настоящее время доступно on-line программное обеспечение, разработанное разными коллективами и предназначенное для выбора потенциальных сайтов систем TALENs [54–59] и CRISPR/Cas9 [47, 60–62], а также определения возможных нецелевых эффектов.

Создание генетических конструкций, экспрессирующих CRISPR и TALEN

TALEN. ДНК-связывающий домен состоит из практически идентичных повторов, поэтому при создании генетических конструкций, экспрессирующих TALENs, существуют определенные трудности технического характера. Предложен ряд методов, которые позволяют создавать ДНК-связывающие домены TALE, состоящие из 20–30 и даже болееномеров. Одна из стратегий основана на стандартном клонировании ДНК с использованием гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции типа II и лигирования – REAL (REstriction and Ligation [63]). На первом этапе подготавливают библиотеку мономеров, в которые с 5'- и 3'-концов внесены сайты эндонуклеаз рестрикции. После гидролиза ДНК проводят попарное лигирование, в результате чего образуются димеры (N_1N_2 , N_3N_4 , $N_{2k-1}N_{2k}$), которые затем объединяют в тетрамеры и так далее. Правильная последовательность при этом достигается использованием различных эндонуклеаз рестрикции. Эта методика весьма трудна и длительна, поскольку на каждом этапе необходимо очищать продукты реакции, а также подтверждать правильность ориентации. Для ускорения этого процесса создана би-

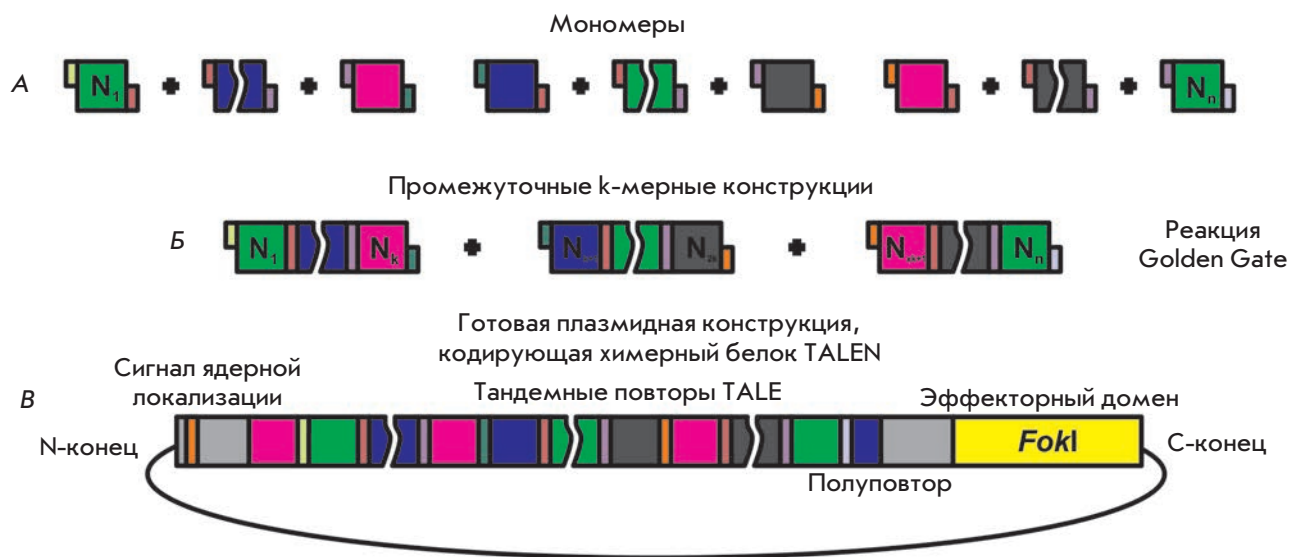


Рис. 4. Схема стратегии модульного иерархического лигирования на основе системы клонирования Golden Gate для создания генетических конструкций, экспрессирующих химерные белки TALEN. А – на первом этапе создают библиотеку мономеров, которая представляет собой своеобразный «конструктор», состоящий из набора деталей. Такие детали – амплифицированные последовательности мономеров с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Праймеры подбирают таким образом, чтобы в результате гидролиза эндонуклеазами рестрикции типа IIS образовывались липкие концы, которые определяют позицию мономера в готовой конструкции. Б – в одной реакции Golden Gate возможно одновременное лигирование нескольких мономеров, в результате чего получают промежуточные k-мерные конструкции. В – на последнем этапе проводят реакцию Golden Gate, в результате которой происходит рестрикция и лигирование нескольких промежуточных k-мерных конструкций и плазмиды «основы», содержащей остальные элементы TALEN

блиотека из 376 элементов, состоящая из моно-, ди-, три- и тетрамеров (REAL-Fast, [64]).

Для увеличения эффективности и ускорения процесса сборки используют реакцию Golden Gate [65, 66], которая представляет собой одновременное лигирование и гидролиз эндонуклеазами рестрикции в одной реакционной смеси (рис. 4). В реакции Golden Gate используют эндонуклеазы рестрикции типа IIS, которые гидролизуют ДНК на фиксированном расстоянии от сайта узнавания, например, BsmBI или BsaI. Таким образом при лигировании происходит «бесшовная» сборка, поскольку эндонуклеазы рестрикции «отрезают» свой собственный сайт от мономера, и продукт лигирования уже не подвергается рестрикции. Амплифицируя последовательности мономеров (NI, HD, NG и NN) с различными олигонуклеотидными праймерами, создают библиотеку, которая содержит различные варианты всех четырех мономеров, соответствующие различным позициям (например, от 1 до 20) в будущем ДНК-связывающем домене. При обработке таких мономеров эндонуклеазами рестрикции IIS образуются липкие концы, комплементарные липким концам соседних мономеров.

В одной реакции можно лигировать сразу несколько мономеров, например, четыре [67] или шесть [68] одновременно. Далее, опять используя реакцию Golden Gate, можно лигировать несколько тетра- или гексамеров и клонировать уже полную последовательность в плазмидный вектор, содержащий 3'-полуповтор и каталитический домен FokI.

С целью сокращения времени создания генетических конструкций, экспрессирующих TALEN, предложен метод, позволяющий избежать лигирования ДНК и соответственно этапов, связанных с проверкой его результатов. Выбранный ДНК-связывающий домен собирается из мономеров с длинными специфическими одноцепочечными концами (10–30 нуклеотидов). При смешивании нескольких мономеров происходит отжиг комплементарных одноцепочечных концов, в результате чего мономеры выстраиваются в нужной последовательности. Затем клетки *E. coli* трансформируют полученной смесью, и лигирование происходит уже в бактериях с участием их собственных ферментов [69].

Перечисленные методы создания генетических конструкций, экспрессирующих TALENs,

относительно просты и по разным оценкам на их выполнение требуется 1–2 недели при наличии соответствующих реактивов. Помимо простоты и эффективности, данная технология также отличается доступностью – на сегодняшний день через депозитарий Addgene (<http://www.addgene.org/TALEN/>) возможно приобрести наборы для создания TALENs, разработанные разными коллективами авторов [64, 68–71], и использовать их в лабораторных условиях.

Также появились системы для автоматизированного высокоэффективного производства конструкций, экспрессирующих нуклеазы TALENs. Так, например, коммерческая платформа компании Collectis Bioresearch позволяет создавать до 7200 таких конструкций в год. В научной литературе описаны три метода [72–74], основанные на использовании твердофазных поверхностей. Эти методы позволяют избежать анализа промежуточных конструкций, их очистки с помощью выделения из геля и других стадий, что делает эти методы пригодными для автоматизированного производства и ускоряет процесс. Суть этих методов заключается в использовании покрытых стрептавидином магнитных частиц, к которым присоединены биотинилированные двухцепочечные ДНК-адаптеры. В результате последовательного чередования этапов гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирования наращивается последовательность мономеров, связанная через адаптер с магнитной частицей. Продукты реакций очищают с помощью отмывочных буферов на магнитной подложке. При этом побочные продукты и компоненты реакций вымываются, а целевой продукт, благодаря притяжению между магнитными частицами и подложкой, остается в пробирке (или лунке). В конце с помощью эндонуклеаз рестрикции расщепляют связи между биотинилированным адаптером и синтезированной последовательностью мономеров ДНК-связывающего домена TALEN, которую затем в результате лигирования ДНК клонируют в плазмидный вектор. С помощью такого метода можно быстро и эффективно параллельно синтезировать генетические конструкции в 96-луночных планшетах, используя мультиканальные автоматические пипетки или роботизированные раскапывающие станции.

CRISPR/Cas9. Показано, что для разрезания ДНК *in vitro* [43, 52] и в бактериальных клетках [42] с использованием CRISPR/Cas9 необходимы и достаточны следующие компоненты: некодирующие РНК *tracrRNA* и *pre-crRNA*, РНКазы III и белок Cas9. Использование этой системы в клетках млекопитающих имеет ряд особенностей.

Во-первых, нуклеаза SpCas9 (Cas9 *S. pyogenes*) должна быть адаптированной для адекватной транс-

крипции в клетках высших эукариот, в частности, оптимизированной по кодонам, а для обеспечения ядерной компарментализации необходимо присоединить сигналы ядерной локализации (NLS – nuclear localization signal); двух NLS достаточно для эффективного направления Cas9 в ядро [46].

Во-вторых, для созревания *pre-crRNA* в клетках эукариот не требуется вносить экзогенную РНКазу III, так как с этой функцией успешно справляются собственные клеточные РНКазы [75–77].

В-третьих, вместо двух некодирующих РНК чаще вводят единую химерную *sgRNA*, в которой зрелая *crRNA* соединена с частью *tracrRNA* с помощью синтетической структуры «петля-стебель» для имитации естественного дуплекса *crRNA-tracrRNA* [43] (рис. 5). Для транскрипции *sgRNA* необходим соответствующий промотор, например, U6-промотор РНК-полимеразы III.

В лаборатории Фенга Занга созданы базовые плазмидные конструкции, содержащие элементы, необходимые для работы CRISPR/Cas9. Плазмиды pX260/pX334 содержат три экспрессионные кассеты: Cas9-нуклеаза/никаза, CRISPR РНК-матрица и *tracrRNA* (рис. 6). Чтобы изменить последовательность-мишень, из такой конструкции необходимо всего

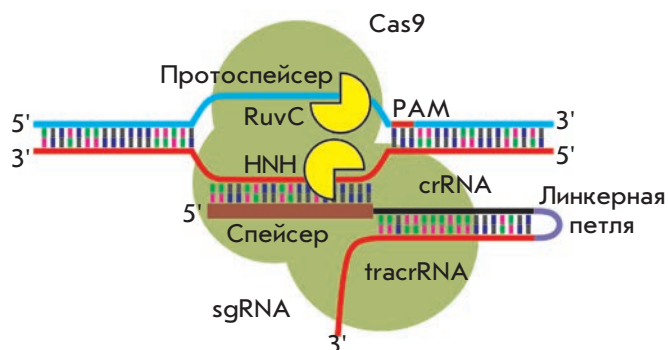


Рис. 5. Единая химерная *sgRNA* для внесения двухцепочечных разрывов в целевых локусах. Комплекс *sgRNA* и Cas9 способен вносить двухцепочечные разрывы в выбранных сайтах ДНК. *SgRNA* – искусственно созданная конструкция, представляющая собой объединенные в одну молекулу РНК элементы системы CRISPR/Cas9: *crRNA* и *tracrRNA*. Протоспейсер – сайт, который узнает система CRISPR/Cas9. Спейсер – последовательность в составе *sgRNA*, которая отвечает за связывание целевого сайта по принципу комплементарного взаимодействия. RuvC и HNH – каталитические домены, которые вносят разрывы в цепи ДНК в целевом сайте. PAM – короткий мотив (NGG в случае CRISPR/Cas9), наличие которого с 3'-конца протоспейсера обязательно для внесения разрыва

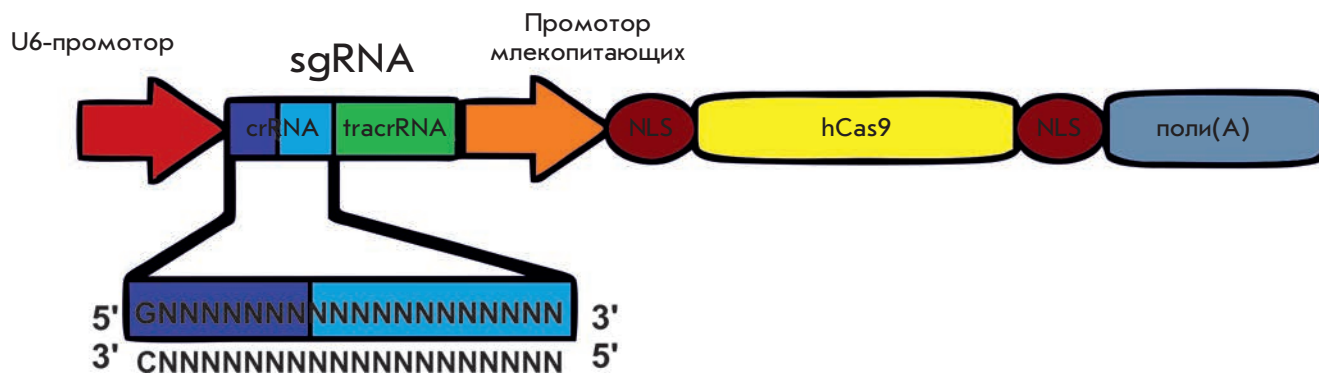


Рис. 6. Схема генетической конструкции, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas. hCas9 – последовательность белка Cas9, оптимизированная для экспрессии в клетках эукариот. sgRNA – единая химерная РНК, содержащая части crRNA и tracrRNA, необходимые для функционирования. NLS – сигнал ядерной локализации, который обеспечивает попадание конструкций в ядро. Поли(A) – сигнал полиаденилирования

лишь вырезать исходную 30-нуклеотидную направляющую последовательность, фланкированную сайтами BbsI, и заменить ее на искусственно синтезированную. С этой целью 30-членные олигонуклеотиды, комплементарные целевой последовательности и содержащие соответствующие липкие концы, сплавляют вместе и лигируют с плазмидой.

Плазмиды pX330/pX335 содержат две экспрессионные кассеты: Cas9-нуклеаза/никаза, химерная sgRNA, включающая 85-нуклеотидную tracrRNA. Принцип смены направляющей последовательности тот же, но длина ее меньше – 20 нуклеотидов, причем 20-м должен быть гуанин, так как используемый в данном случае U6-промотор содержит это основание в точке старта транскрипции. Кроме того, в эти плазмиды могут быть встроены дополнительные элементы, такие, как сайты 2A-GFP или 2A-Puro, для последующей селекции несущих плазмиду клеток.

Доставка конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9

Для трансформации клеточных культур человека, мыши и других организмов чаще используют плазмиды, обеспечивающие активную продукцию нуклеазы Cas9 и sgRNA *in vitro* [46, 78–80]. В случае трансформации целого организма разработан метод, основанный на микроинъекции мРНК cas9 и sgRNA в одноклеточные эмбрионы [81–83]. Этот метод активно применяют у мышей, полосатого данио (*Danio rerio*) и дрозофилы. Для широкомасштабного охвата генома нокаута с использованием больших библиотек sgRNA используют лентивирусные векторы [84, 85]. У растений, клетки которых имеют плотную клеточную стенку, широко применяется метод плазмидной трансформации протопласта в клеточ-

ных культурах [86, 87], а также агроинфильтрация при помощи *Agrobacterium tumefaciens* [88, 89].

Анализ мутаций, вызванных действием CRISPR/Cas9 и TALEN

В результате активности систем CRISPR/Cas9 или TALENs в эукариотическую ДНК вносится двухцепочечный разрыв в области протоспейсера CRISPR/Cas9 или спейсерной последовательности, разделяющей сайты узнавания TALEN (рис. 7). В отсутствие гомологичной донорной ДНК двухцепочечный разрыв репарируется путем нехомологичного сшивания концов. В ходе этого процесса возникают ошибки, и с большой частотой в области соединения образуются небольшие инсерции или делеции [90]. Разработан ряд методик, позволяющих изучать активность искусственных нуклеаз в эукариотических клетках, основой которых является детекция изменений в целевой ДНК (рис. 7).

Изучить нуклеотидные последовательности мутантных аллелей, возникающих в результате нехомологичного сшивания концов ДНК, а также наиболее точно количественно определить эффективность работы искусственных нуклеаз позволяет метод, основанный на ТОРО-клонировании (рис. 7). Из клеток эукариот, обработанных искусственными нуклеазами, выделяют геномную ДНК, и методом ПЦР амплифицируют участок ДНК, содержащий сайт узнавания нуклеазы. Продукты ПЦР клонируют в плазмидном векторе с последующим секвенированием клонов, полученных после трансформации клеток *E. coli* [72]. Таким образом определяют разнообразие возникающих мутаций и их частоту. Более того, если из клеток, обработанных искусственными нуклеазами, получить клональные популяции, то после секвенирования

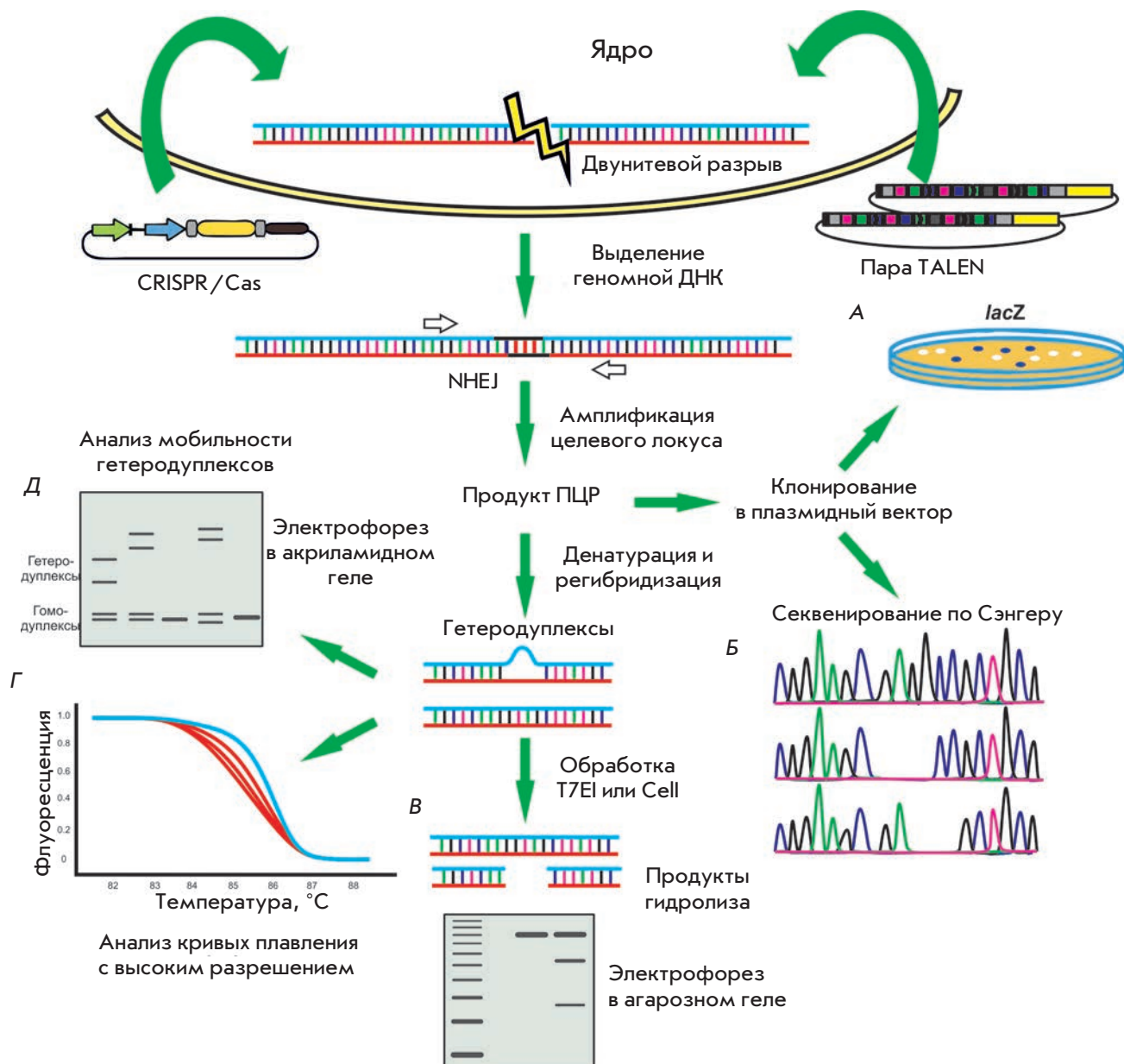


Рис. 7. Схема различных анализов для выявления и определения эффективности внесения двухцепочечного разрыва системами TALEN и CRISPR/Cas. Сначала конструкции, кодирующие CRISPR/Cas9 или TALEN, доставляют в клетки. В клетках происходят двухцепочечные разрывы в целевых локусах, которые репарируются с помощью негомлогичного соединения концов (NHEJ). В результате образуются инсерции или делеции. Далее амплифицируют целевой локус с помощью ПЦР. Продукты ПЦР анализируют с помощью следующих методов. А – клонируют целевой участок в плазмидный вектор. Из-за инсерций или делеций происходит нарушение или наоборот восстановление рамки считывания гена *lacZ*. В результате подсчета синих и белых колоний после трансформации *E. coli* определяют эффективность работы систем CRISPR/Cas9 или TALEN; Б – после клонирования в плазмидный вектор и трансформации *E. coli* производят секвенирование по Сэнгеру. Подсчитывают клоны, содержащие инсерции/делеции, определяют эффективность; В – после денатурации и регибридации продукта ПЦР образуются гетеродуплексы ДНК – например, одна цепь «дикого типа», другая содержит делецию. После обработки ферментами, разрезающими ДНК в неспаренных участках, наносят образцы на гель и проводят электрофорез. Продукты гидролиза означают, что проба содержала гетеродуплексы, следовательно, в геномной ДНК возник двухцепочечный разрыв под действием CRISPR/Cas9 или TALEN; Г – в результате анализа кривых плавления с высоким разрешением также можно детектировать гетеродуплексы. Синий – контрольные образцы, красный – образцы, содержащие гетеродуплексы; Д – неспаренные участки ДНК снижают мобильность гетеродуплексов в 15% полиакриламидном геле. После гель-электрофореза можно наблюдать полосы, соответствующие гомо- и гетеродуплексам

можно отобрать линии, несущие определенные мутации. Так, например, в результате отбора клонов с делецией определенного размера были получены клеточные линии, в которых удалось восстановить рамку считывания, нарушенную мутацией, вызывающей мышечную дистрофию Дюшенна [91].

Активность искусственных нуклеаз анализируют при помощи ферментов, которые расщепляют фосфодиэфирные связи на неспаренных участках ДНК (рис. 7). При амплификации участка, выбранного в качестве мишени для искусственных нуклеаз, получается смесь из молекул ДНК, нуклеотидные последовательности которых отличаются из-за возникших при негомологичном соединении концов инсерций или делеций. При денатурации, а затем регибридизации продукта ПЦР образуются гетеродуплексы, содержащие петли на неспаренных участках. Регибридизованные продукты ПЦР обрабатывают ферментами, например, эндонуклеазой I фага T7 [92] или нуклеазами семейства *CelI* [93], а затем полученные фрагменты разделяют электрофоретически. Обнаружение продуктов гидролиза свидетельствует о присутствии в смеси продуктов ПЦР фрагментов, содержащих инсерции или делеции, возникшие при негомологичном соединении концов. По соотношению интенсивности основного продукта и фрагментов, возникших при гидролизе, можно оценить эффективность работы искусственных нуклеаз, однако это неточная оценка [92].

Образовавшиеся гетеродуплексы по своим свойствам отличаются от гомодуплексов. Одно из таких отличий – изменение профиля кривой плавления, которое можно обнаружить путем анализа кривых плавления с высоким разрешением (HRMA) (рис. 7). С помощью ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих флуоресцентных красителей амплифицируют небольшой участок (100–300 п.н.), содержащий сайт двухцепочечного разрыва. Затем после денатурации и регибридизации проводят HRMA. В результате сравнения контрольных и опытных образцов можно определить изменения профиля кривой плавления, а следовательно, и изменения в нуклеотидных последовательностях, возникших в результате негомологичного сшивания концов [94]. Этот анализ отличается чувствительностью и простотой, однако это качественный метод, который не позволяет точно оценить эффективность работы искусственных нуклеаз, а также характер изменений ДНК.

Еще один метод, с помощью которого можно определить был ли внесен в целевой сайт двухцепочечный разрыв, это анализ электрофоретической подвижности гетеродуплексов. Неспаренные участки одноцепочечной ДНК, образующие петли в гетероду-

плексах, снижают их подвижность в 15% полиакриламидном геле по сравнению с гомодуплексами. Благодаря этому свойству можно не только установить, произошел ли двухцепочечный разрыв, но и оценить разнообразие возникающих мутаций, а также генотипировать различные клоны, поскольку различные по размеру делеции или инсерции по-разному меняют подвижность гетеродуплексов. При этом профиль подвижности для линий, содержащих одинаковые мутации, также будет одинаковым [95].

Количественно оценить и сравнить эффективность искусственных нуклеаз позволяют методы, в которых применяют репортерные генетические конструкции, содержащие гены люминесцентных белков. При этом используется явление одноцепочечного отжига (Single-strand annealing, SSA), одного из способов репарации двухцепочечных разрывов в геноме эукариот. Если двухцепочечный разрыв происходит между двумя прямыми повторами, то в результате SSA происходит отжиг комплементарных последовательностей, фланкирующих разрыв. Затем негомологичные участки подвергаются гидролизу специфическими нуклеазами, а в одноцепочечных участках происходит синтез и лигирование новой ДНК. Последовательность между прямыми повторами, где произошел двухцепочечный разрыв, всегда делетируется, а вместо двух повторенных последовательностей остается один. Этот процесс используют для восстановления репортерного гена, например гена люциферазы. После двухцепочечного разрыва, внесенного в целевую последовательность, клонированную в плазмидный вектор между двумя повторенными элементами гена-репортера, в результате SSA происходит восстановление его (репортера) функции. Таким образом, по уровню люминесценции можно количественно оценить эффективность работы искусственных нуклеаз. При этом репортерные конструкции трансфицируют в эукариотические клетки, например в линии НЕК293 или некоторые линии дрожжей. Недостатком этого метода является то, что он не учитывает геномного окружения, в котором находится сайт разрезания, поэтому его результаты могут не коррелировать с результатами, полученными при работе с целевыми сайтами в геноме [96].

Учеными из Японии разработан метод анализа, основанный на нарушении/восстановлении функции гена *lacZα* (рис. 7). С этой целью сайт для внесения двухцепочечного разрыва клонируют в ген *lacZα*. Олигонуклеотидные праймеры при этом выбирают таким образом, чтобы целевой сайт дикого типа нарушал (1) или сохранял (2) рамку считывания. Если в сайте произошел двухцепочечный разрыв, репарированный с помощью негомологичного сшивания концов, то в первом случае после клонирования в ре-

зультате делеций или инсерций в 1/3 конструкций рамка считывания будет восстановлена. Соответственно после трансформации клеток *E. coli* полученными конструкциями часть колоний будет иметь синюю окраску. Во втором случае в 2/3 конструкций из-за мутаций, вызванных искусственными нуклеазами, рамка считывания будет нарушена. Колонии, в которые попадут такие генетические конструкции, будут иметь белую окраску. Эффективность искусственных нуклеаз можно тогда определить путем простого подсчета доли синих или белых колоний в первом и втором случаях соответственно [97].

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ CRISPR/Cas9 И TALEN

Нуклеаза делает в сайте-мишени двухцепочечные разрывы, которые репарируются в клетке по одному из двух возможных механизмов:

Негомологичное соединение концов, при котором возникают ошибки, что приводит в результате к появлению в целевом локусе мутаций по типу инделей (инсерций, делеций).

Гомологичная рекомбинация, при которой неповрежденный гомолог служит матрицей для восстановления исходной структуры ДНК; это событие происходит в клетке довольно редко, но использование CRISPR/Cas9 и TALENs позволяет повысить вероятность прохождения гомологичной рекомбинации на несколько порядков. Если добавить к компонентам CRISPR/Cas9 искусственно синтезированную молекулу ДНК, имеющую гомологию с последовательностью нуклеотидов в месте разрыва, то она может служить матрицей для другого способа репарации – HDR (homology-directed repair), при котором небольшой фрагмент искусственной матрицы встраивается в целевой локус. В качестве такой матрицы чаще всего используют два типа конструкций: одноцепочечные олигонуклеотиды или плазмидные векторы. В первом случае искусственно синтезируют олигонуклеотиды, гомологичные сайту внесения двухцепочечного разрыва, оптимальная длина которых составляет около 90 нуклеотидов [98]. Такие олигонуклеотиды могут содержать небольшие отличия от целевого сайта. При использовании плазмидных векторов в качестве донорных молекул для рекомбинации в них клонируют достаточно длинные плечи гомологии (от 500 до нескольких тысяч пар нуклеотидов). Такие плечи гомологии могут фланкировать дополнительные элементы, например, репортерные гены, гены устойчивости к антибиотикам и так далее. С помощью HDR в целевой локус можно поместить сайт рестрикции, маркерную метку или же нуклеотиды для исправления «неправильных» ДНК. Однако HDR активно происходит только в делящихся клетках, и ее эффективность очень сильно зависит

от типа клетки, стадии жизнедеятельности, а также целевого локуса генома и самой матрицы [99].

Таким образом, с помощью сайт-специфических нуклеаз можно получить следующие мутации:

- негомологичное соединение концов в отсутствие донорной плазмиды опосредует делеции или инсерции нескольких нуклеотидов сайта-мишени и, как один из результатов, генный нокаут из-за мутаций рамки считывания и образования стоп-кодонов [100];
- в присутствии двухцепочечных олигонуклеотидов или донорной плазмиды фрагменты ДНК длиной свыше 14 т.п.н. могут встраиваться посредством лигирования, опосредованного негомологичным сшиванием концов [101, 102];
- одновременное внесение нескольких двухцепочечных разрывов может приводить к делециям, инверсиям или транслокациям участков ДНК, расположенных между этими разрывами [46, 103];
- гомологичная рекомбинация в присутствии донорной плазмиды с плечами гомологии, фланкирующими встраиваемый фрагмент [104], линейной донорной последовательности с гомологией менее 50 п.н. [105] или олигонуклеотида [103] приводит к внедрению одного или нескольких трансгенов для коррекции или замены существующих генов.

На сегодняшний день описанные выше методы активно применяются в фундаментальных и прикладных исследованиях. При этом редактирование генома возможно как *in vitro* при доставке элементов систем TALEN или CRISPR/Cas в культуры клеток, так и *in vivo* с помощью инъекций мРНК в зиготы (рис. 3).

Редактирование генома *in vitro*

Клеточные линии HEK293T/HEK293FT, легко трансформируемые плазмидами и относительно простые в поддержании, наиболее часто используются для проверки эффективности работы систем TALENs и CRISPR/Cas в человеческой модели *in vitro* [46, 50, 68, 78, 106]. По данным разных авторов уровень целевых мутаций, а также гомологичной рекомбинации с донорными плазмидами/олигонуклеотидами колеблется в широких пределах, что, вероятно, зависит не только от метода, но и от клеточной линии и самой геномной мишени (таблица). Культивируемые линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток человека представляют особый интерес для регенеративной медицины, изучения структуры и функционирования сложных генных сетей, создания систем для поиска лекарственных средств и множества других фундаментальных и биомедицинских исследований.

С использованием системы TALEN Динг и соавт. [71] внесли двухцепочечные разрывы и получили линии стволовых клеток человека с мутациями в раз-

Геномная инженерия с помощью TALEN и CRISPR/Cas

Нуклеаза	Объект	Ген	Назначение	Источник
TALEN	Клетки человека (<i>Homo sapiens</i>)	<i>ccr5, akt2, e17k, angptl3, apob, atgl, c6orf106, celsr2, cfr, ciita, foxo1, foxo3, gli1, glut4, hbb, hdac1, hdac2, hdac6, hmga2, hoxa13, hoxa9, hoxc13, hpvt, il2rg, jak2, kras, linc00116, maoa, map2k4, mdm2, met, mlh1, msh2, mutyh, myc, mycl1, mycn, nbn, ncor1, ncor2, nlr5, ntf3, pdgfra, pdgfrb, phf8, plin1, pms2, ppp1r12c (aavs1), ptch1, pten, rara, rbbp5, recql4, ret, runx1, sdhb, sdhc, sdhd, setdb1, sirt6, smad2, sort1, sox2, klf4ss18, suz12, tfe3, tp53, trib1, tsc2, ttn, vhl, xpa, xpc, abl1, alk, apc, atm, axin2, bax, bcl6, bmpr1a, brca1, brca2, cbx3, cbx8, ccnd1, cdc73, cdk4, cdh4, chd7, ctmb1, cylld, ddb2, ercc2, ewsr1, ext1, ext2, ezh2, fanca, fancf, fancg, fes, fgfr1, fh, flcn, flt4, mstn, aavs2, oct4, pitx3</i>	Нокаут, встройка	[67, 68, 70–72, 74, 92, 176–179, 180]
	Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>URA3, ADE2, LYS3</i>	Нокаут, встройка	[181]
	Нематода (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>ben-1, tex-1, sdc-2</i>	Нокаут	[182]
	Дрозофила (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>yellow, crhdr1, ponzr1, bmil, cdh5, dip2a, elmo1, epas1b, fh, golden, gria3, hey2, hif1ab, ikzf1, jak3, moesina, myod, phf6, ppp1cab, ryr1a, ryr3, scl6a3, tbx6, tnkb, th, fam46c, smad5</i>	Нокаут, встройка	[94, 183–187]
	Шелкопряд (<i>Bombyx mori</i>)	<i>blos2</i>	Нокаут	[188]
	Сверчок (<i>Gryllus bimaculatus</i>)	<i>lac2</i>	Нокаут	[189]
	Шпорцевая лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>)	<i>ets1, foxd3, grp78/bip, hhex, noggin, ptf1a/p48, sox9, vpp1</i>	Нокаут	[190]
	Мышь (<i>Mus musculus</i>)	<i>c9orf72, fus, lepr, pak1ip1, gpr55, rprm, fbx6b, smurf1, tmem74, wdr20a, dcaf13, fam73a, mlkl, mstn, pibf1, sepw1, rab38, zic2</i>	Нокаут, встройка	[179, 191–196]
	Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>bmpr2, IqM</i>	Нокаут	[197, 198]
	Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	<i>amely, dmd, gdf8, ggta, ghdrhdr, il2rg, ldlr, rag2, rela (p65), sry</i>	Нокаут	[199]
	Корова (<i>Bos taurus</i>)	<i>acan, gdf8, ggta, mstn, prnp</i>	Нокаут	[179, 199]
	Арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>adh1</i>	Нокаут	[70]
	Табак (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>surA, surB, hax3</i>	Нокаут, встройка	[156, 157]
	Коротконожка (<i>Brachypodium distachyon</i>)	<i>aba1, cxx2, coi1, hta1, rht, sbp, smc6, spl</i>	Нокаут	[154]
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>avrxa7, pthxo3, badh2, cxx2, dep1, sd1</i>	Нокаут	[154, 155]	
CRISPR/Cas	Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>CAN1, ADE2</i>	Нокаут, встройка	[200]
	Клетки человека (<i>Homo sapiens</i>)	<i>dnmt3b-tdTomato, pou5f1(oct4), emx1, dyrk1a, grin2b, egfp, ccr5, c4bpb, pvalb, aavs, akt2, celsr2, ciita, glut4, linc00116, sort1, ldlr</i>	Нокаут, встройка	[46, 51, 78, 80, 201, 202]
	Нематода (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>dpy-11, unc-4, ben-1, unc-36, daf-2, klp-12, lab-1, egfp, dpy-11, lin-5, rol-1, dpy-3, unc-1, dpy-13, unc-119, klp-12</i>	Нокаут, встройка	[119–124, 126]
	Дрозофила (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>yellow, white, rosy, cg14251 (k81), cg3708cg17629 (kl-3), light</i>	Нокаут, встройка	[130–133]
	Полосатый данио (<i>Danio rerio</i>)	<i>etsrp, gata5, etsrp, gsk3b, apoea, fh, fh1, th1, rgs4, tia1l, tph1a, drd3, egfp, tyr, gol, mitfa, ddx19, sema3fb, dre-mir-126a, dre-mir-126b, dre-mir-17a-1-dre-mir-92a-1, dre-mir-17a-2-dre-mir-92a-2, fgd5, ensdarg00000070653, ensdarg00000076787, psmf1, dre-mir-126a, dre-mir-17a-2, dre-mir-92a-2, tardbp, tardbpl, c13h9orf72</i>	Нокаут, встройка, хромосомные перестройки	[81, 82, 203–206]
	Лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>)	<i>tyr, six3</i>	Нокаут	[207]
	Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	<i>gdf8, p65</i>	Нокаут, встройка	[208]
	Мышь (<i>Mus musculus</i>)	<i>tet1, tet2, tet3, sry, uty, rosa26, hpvt, egfp, th, rheb, uhrf2</i>	Нокаут, встройка	[83, 144, 209, 210]
	Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>dnmt1, dnmt3a, dnmt3b, tet1, tet2, tet3, mc3r, mc4r</i>	Нокаут, встройка	[144, 145, 211]
	Арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>pds33, fls2, bri1, jaz1, gaj, chl, chl2, 5g13930</i>	Нокаут, встройка	[87, 88, 149]
	Табак (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>pds</i>	Нокаут, встройка	[88, 89]
	Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>ods, badh2, mrk2, 02g23823, roc5, spp, ysa, myb1, cao1, lazy1, sweet11, sweet14</i>	Нокаут, встройка	[86, 150, 152]
	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>mlo</i>	Нокаут	[86]

ных генах, вызывающих заболевания. Всего мутации внесли в 15 генов и провели подробный анализ фенотипа дифференцированных производных стволовых клеток с мутациями в четырех из них – *APOB*, *SORT1*, *AKT2* и *PLIN1*. Благодаря таким клеточным моделям были получены новые данные о роли этих генов в патогенезе заболеваний. Например, показано, что продукт гена *APOB* необходим для репликации вируса гепатита С в гепатоцитах человека. В клетках с гомозиготной мутацией в этом гене репликация вируса существенно снижена. А мутация E17K в гене *AKT2* приводит к снижению синтеза глюкозы в гепатоцитах человека и увеличению уровня триглицеридов в адипоцитах.

Помимо создания моделей, необходимых для разработки подходов к лечению заболеваний, искусственные нуклеазы могут использоваться непосредственно в терапевтических целях. Одно из таких направлений – терапия хронических вирусных инфекций. Могут быть сконструированы нуклеазы TALENs, позволяющие вносить мутации в открытые рамки считывания таких вирусов, как ВИЧ, вирус гепатита В, герпесвирус, которые могут находиться в организме в латентном состоянии и не поддаваться терапии, направленной на реплицирующиеся вирусы [107, 108]. Так с помощью TALENs можно модифицировать ген С-С рецептора хемокина 5 Т-лимфоцитов, мутации в котором делают человека невосприимчивым к ВИЧ [100, 109].

С помощью технологии, основанной на CRISPR/Cas9, созданы изогенные стволовые клетки человека [110], разрабатываются методы исправления мутантного фенотипа клеток [111], проводятся работы по регуляции экспрессии генов [112–116], изучению функциональных взаимоотношений между большими группами генов [84, 85] и визуализации функционирующих районов генома в живых клетках [117].

Создание панелей изогенных плюрипотентных стволовых клеток человека позволит осуществить моделирование наследственных и многофакторных заболеваний, скрининг больших библиотек лекарственных средств, а также поиск новых мутаций, вовлеченных в патологический процесс. В настоящее время активно ведутся работы по всем этим направлениям. Так, CRISPR/Cas9-систему эффективно использовали для создания модели синдрома ICF (ICF – immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome; иммунодефицит, нестабильность центромерных районов хромосом и лицевые аномалии) на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека. Были получены гомозиготные мутации в гене *DNMT3B* с частотой 63%, при этом клетки имели фенотип центромерной нестабильности [110]. Особенно актуальным представляется

изучение тяжелых нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, различные мышечные атрофии.

Поскольку Cas9 узнает конкретную мишень в геноме при участии короткой направляющей последовательности в sgRNA, то в современных условиях относительно просто создать достаточно большую библиотеку олигонуклеотидов и соответственно sgRNA, охватывающую масштабы целого генома. А использование в качестве вектора для доставки компонентов CRISPR/Cas9 лентивирусов, которые стабильно поддерживаются в геноме и реплицируются вместе с геномной ДНК, позволило разработать новую технологию GeCKO – CRISPR-Cas9-нокаут в масштабе генома (Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout) [84]. Большая библиотека sgRNA позволяет выключить транскрипцию многих генов одновременно и установить тем самым функциональные взаимоотношения между ними, роль в тех или иных процессах жизнедеятельности или вовлеченность в патологический процесс. Так, при использовании лентивирусной библиотеки, охватывающей 18080 генов (три-четыре sgRNA на каждый ген), выявлены гены, необходимые для жизнедеятельности раковых клеток (A375 клеточная линия меланомы человека) и плюрипотентных стволовых клеток (линия HUES62) [84]. Показано, что в формировании резистентности к вемурафенибу (PLX), который является BRAF-ингибитором протеинкиназ при меланоме, участвуют не только гены *NF1* и *MED12*, но ген *CUL3*, а также комплекс гистон-специфических ацетилтрансфераз STAGA: *TADA1* и *TADA2* [84]. При использовании лентивирусной библиотеки, содержащей порядка 73000 sgRNA, на примере линий опухолевых клеток KBM7 и HL60 изучены гены, участвующие в пролиферации и клеточном цикле [83]. Показано, что мутации, приводящие к формированию нефункциональных продуктов четырех генов репарации однонуклеотидных замен в ДНК (MMR) – *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*, обуславливают устойчивость к нуклеотидному аналогу 6-тиогуанину и, следовательно, обеспечивают пролиферацию клеток. Изучена также работа генов *TOP2A*, *CDK6*, *BCR*, *ABL1* и генов, кодирующих рибосомные белки.

Таким образом, использование библиотек CRISPR/Cas9 позволяет осуществлять функциональный скрининг геномов, который может дать важнейшие сведения о физиологии и биохимии клеток разного типа, поможет раскрыть молекулярные механизмы развития заболеваний и выявить потенциальные мишени для лекарственной и генной терапии.

Методы, основанные на использовании системы CRISPR/Cas9, могут эффективно применяться для редактирования геномов культивируемых

стволовых клеток. В частности, применение систем редактирования геномов позволяет исправлять точечные мутации в клетках, полученных от больных. Объектом исследования в данном случае могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и региональные стволовые клетки. При этом донорными молекулами могут служить как сложные генетические конструкции, так и одноцепочечные ДНК-олигонуклеотиды [98].

Интересным примером подобного подхода представляется работа, в которой осуществлена коррекция локуса *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductor regulator, муковисцидозный регулятор трансмембранной проводимости) в культивируемых кишечных стволовых клетках, полученных от больных муковисцидозом (CF – cystic fibrosis, муковисцидоз) [111]. Этот подход позволяет получать так называемые органоиды – функциональные многоклеточные образования с исправленным геномом, аутологичные по отношению к донору клеток, которые могут быть введены обратно в организм больного. Безусловно, данное направление открывает большие перспективы для клеточной терапии заболеваний человека.

В случае функциональной коррекции генетических аномалий, связанных с делецией генов или нарушениями экспрессии, которые выражаются в существенном снижении уровня продуктов гена (белка или РНК), можно использовать контролируемое внесение трансгенов в геном. Существуют участки генома, внесение трансгенов в которые считается безопасным. Это такие сайты, как AAVS1, которые обеспечивают стабильную экспрессию введенного трансгена [118]. Таким образом, системы TALENs и CRISPR/Cas могут эффективно применяться в функциональной геномике клеток, для создания клеточных моделей заболеваний человека и клеточной терапии.

Редактирование генома *in vivo*

В генетике за многие годы ее существования сформировался ряд модельных объектов, изученных наиболее подробно и используемых в большинстве фундаментальных и прикладных исследований. К модельным организмам относятся, например, дрожжи, нематода, дрозофила, арабидопсис, полосатый данио, лабораторная мышь и крыса. На этих и ряде других модельных организмов активно проводятся эксперименты по геномной инженерии с помощью систем CRISPR/Cas9 и TALENs.

Различные варианты применения CRISPR/Cas и модификации технологии редактирования генома у нематоды *Caenorhabditis elegans* представлены в целом ряде работ [119–126]. С помощью инъекции мРНК/белка Cas9 и продуцированной *in vitro/in vivo* sgRNA в клетки зародышевой линии у взрослых жи-

вотных в следующем поколении получали стабильные целевые модификации генома, включая небольшие инсерции/делеции, более крупные хромосомные делеции и перестройки [119], внедрение трансгена путем гомологичной рекомбинации с донорными молекулами [121, 123]. Такой метод активно используется для изучения процессов дозовой компенсации у нематоды, сравнения функций генов у родственных видов *C. elegans* и *C. briggsae* [122].

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* относится к наиболее изученным модельным объектам. Однако получение новых мутантных аллелей посредством гомологичной рекомбинации по-прежнему остается очень трудоемкой процедурой [127–129]. Инъекция мРНК *cas9* и sgRNA в эмбрионы дрозофилы обеспечивает получение двухцепочечных разрывов в целевых локусах генома, репарация которых приводит к формированию мутаций по типу инсерций/делеций на довольно высоком уровне (таблица). Эмбриональная инъекция позволяет получить мутации в обоих аллелях целевого гена и во всех клетках развивающегося впоследствии взрослого насекомого, однако при этом появляется определенный процент мозаиков [130–132]. Эти мутации стабильно передаются из поколения в поколение, что обеспечивает возможность создания новых линий мух [133]. Недавно было разработано приложение (<http://www.flyrnai.org/crispr>), с помощью которого можно наиболее эффективно планировать эксперименты по редактированию генома у дрозофилы. Таким образом, технология CRISPR/Cas9 позволяет быстро и эффективно получать мутации с целью дальнейшего изучения функционирования генов у *Drosophila*.

Полосатый данио является на сегодняшний день очень популярным объектом не только для фундаментальных исследований структурно-функциональных взаимоотношений в геноме, но и для моделирования метаболических и нейродегенеративных заболеваний человека *in vivo* [134]. Посредством инъекции компонентов CRISPR/Cas9 в эмбрионы полосатого данио получены разнообразные целевые модификации, стабильно передающиеся по наследству (таблица). В 2011 году был открыт международный проект – The Zebrafish Mutation Project – по созданию мутантных аллелей в каждом белоккодирующем гене полосатого данио. Все данные анализируются на веб-сайте http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/zmp. На июнь 2013 года получены мутантные модели 46% всех белоккодирующих генов зебрафиш.

Такие лабораторные животные, как мышь и крыса, считаются важнейшими модельными объектами для изучения заболеваний человека, фундаментальных исследований структуры и функции генов

и регуляции их экспрессии, а также в фармакологии и токсикологии. Ранее линии мышей с нокаутом определенных генов получали с помощью гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках [1, 83], а также посредством инсерционного мутагенеза [135, 136]. Это очень длительные и трудоемкие эксперименты, а получение животных с двойным нокаутом представляет собой еще более сложную задачу. Технология редактирования генома, основанная на CRISPR-Cas9, – это более быстрый и менее трудоемкий способ, позволяющий делать эту работу за один этап. Направленная инъекция сайт-специфических нуклеаз в зиготу на стадии одной клетки обеспечивает возникновение двухцепочечных разрывов в ДНК локуса-мишени [137–139]. Такие разрывы репарируются по механизму негомологичного сшивания концов, что приводит к появлению мутантных крыс и мышей, несущих делеции либо инсерции в разрезанном сайте [140, 141]. При добавлении донорной плазмиды или олигонуклеотида разрывы могут репарироваться с помощью высокоточного механизма гомологичной рекомбинации, что позволяет получить животных, несущих целевые вставки ДНК [83, 142, 143]. Редактирование генома с использованием CRISPR/Cas9 обеспечивает внесение мутаций как в один ген, так и в несколько генов сразу. Так, показано, что CRISPR-Cas9 с высокой эффективностью приводит к появлению в эмбриональных стволовых клетках мыши мутаций в пяти генах одновременно, а введение мРНК *cas9* и sgRNAs, направленных на гены *Tet1* и *Tet2*, в зиготы мыши позволяет получить животных с биаллельными мутациями обоих генов с эффективностью 80% [83]. Аналогичные результаты получены в экспериментах на крысах, причем и мыши, и крысы стабильно наследовали выявляемые мутации [144, 145]. Кроме того, произведена эффективная коррекция мутации в гене *Crygc* у мышей с доминантной формой катаракты, вызванной этой мутацией [146]. Создание модельных грызунов, несущих специфические мутации в нескольких локусах, делает возможным анализ функций генов, входящих в состав генных семейств с избыточными функциями, а также эпистатических взаимодействий генов. Данные, объединяющие информацию по нокауту того или иного гена мыши, собраны на сайте международного проекта IMPC (International mouse phenotyping consortium, <https://www.mousephenotype.org/>).

Редактирование генома с помощью TALENs и системы CRISPR/Cas9 активно используется и у растений. Направленное редактирование геномов растений может применяться для решения задач как фундаментальной – изучение функций генов, так и прикладной науки – получение растений с новыми

свойствами, такими, как устойчивость к патогенам, гербицидам, изменения метаболизма, показателей урожайности и т.д. [147]. При этом для доставки генно-инженерных конструкций в основном используют трансформацию протопласта или *in planta*-экспрессию с *Agrobacterium tumefaciens* (агроинфильтрация) [148]. Таким образом получены генные нокауты и точные модификации у растений арабидопсиса, пшеницы, риса, табака [86, 88, 89, 149–153].

Редактирование геномов растений с помощью системы TALEN к настоящему времени проведено на четырех модельных объектах [70, 154–157]. Примером растения, которое приобрело новые свойства в результате редактирования генома системой TALEN, служит рис, устойчивый к патогену *Xanthomonas oryzae pv.* С помощью искусственных TALENs был внесен двухцепочечный разрыв в сайт узнавания природного TAL-эффектора патогена в локусе гена *Os11N3*. Таким способом были получены растения, устойчивые к заражению *X. oryzae pv* [155].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ TALE И CRISPR/Cas9

Расшифровка кода узнавания белками TALE целевых нуклеотидных последовательностей, а также разработка методов создания искусственных ДНК-связывающих доменов, основанных на этом коде, позволила ученым создавать химерные белки, способные направленно воздействовать на геном. Такие белки состоят из ДНК-связывающего и эффекторного доменов. В качестве эффекторного в основном используются нуклеазные домены, однако в ряде работ получены химерные белки, содержащие помимо ДНК-связывающего домена рекомбиназные, гистон-метилтрансферазные, гистон-деацетилазные домены, а также домены, активирующие или подавляющие экспрессию генов. Такие химерные белки обладают колоссальными перспективами применения как в прикладной, так и в фундаментальной науке. Аналогичным образом модифицируют и систему CRISPR/Cas9: к каталитически неактивному белку Cas9 присоединяют тот или иной эффекторный домен, например, активатор или репрессор транскрипции, флуоресцентный белок GFP и т.д.

Регуляция экспрессии генов с помощью систем TALE и CRISPR/Cas9

Для направленной активации экспрессии генов используются конструкции, содержащие ДНК-связывающий домен TALE и синтетический домен VP64 [158] – TALE-TF. Попадая в ядро, химерный белок связывается с целевой нуклеотидной последовательностью, домен VP64 привлекает эндогенные активаторы экспрессии генов [159]. При этом стати-

стически значимо увеличивается экспрессия целевого гена, что обычно подтверждают с помощью ПЦР в реальном времени. Возможна также активация некодирующих генов, например генов микроРНК [160]. Подавление экспрессии целевого гена может достигаться при использовании химерных белков, содержащих домены KRAB [161] или SRDX [162].

Возможным терапевтическим применением TALE-TF является направленная регуляция экспрессии генов, ассоциированных с заболеваниями человека. Для проверки этого подхода данную стратегию применили для повышения уровня экспрессии гена *FXN*, кодирующего белок фратаксин. Экспансия тринуклеотидных повторов GAA в этом гене приводит к развитию атаксии Фридрейха, при этом структура белка не меняется, однако снижается его экспрессия. Показано, что с помощью TALE-TF можно повысить экспрессию гена *FXN* в фибробластах человека, несмотря на увеличенное число тринуклеотидных повторов [163].

Активация экспрессии эндогенных генов позволяет избежать использования эктопической сверхэкспрессии факторов репрограммирования *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* (OSKM) при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В результате можно получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, не содержащие трансгенов, и соответственно снизить риск инсерционного мутагенеза, который возникает при использовании лентивирусных векторов, экспрессирующих OSKM. Так, репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши к плюрипотентному состоянию было достигнуто с помощью направленной активации экспрессии генов *Oct4* и *Nanog* под действием TALE-TF, содержащих домен VP64 [164].

Совсем недавно были созданы факторы транскрипции для направленной регуляции экспрессии генов, в ответ на внешний химический стимул. Такие факторы состоят из ДНК-связывающего домена TALE и лигандсвязывающего домена рецептора стероидных гормонов. При попадании в клетку лиганда (экидизона) происходит димеризация лигандсвязывающего домена и соответственно активация экспрессии целевого гена [165].

Сочетанием двух крайне перспективных направлений современной биотехнологии – оптогенетики и геномной инженерии – стала разработанная недавно система индуцируемых светом эффекторов транскрипции (light-inducible transcriptional effectors, LITEs). Эта система состоит из двух частей. Первая представляет собой ДНК-связывающий домен TALE, соединенный со светочувствительным доменом – криптохромом 2 (*CRY2*), выделенным из *Arabidopsis thaliana*. Вторая – активатор транскрипции VP64,

соединенный с *CIB1*, который способен взаимодействовать с *CRY2*. Под действием синего света *CRY2* изменяет конформацию и связывается с *CIB1*, таким образом привлекая VP64 к целевому сайту [166]. В работе Конерманн и соавт. [166], разработавших систему LITE, показано статистически значимое увеличение экспрессии ряда генов как в нейронах мыши *in vitro*, так и в головном мозге *in vivo*. Ими также предложена система, в которой домен VP64 заменен метилтрансферазой или деацетилазой, способными модифицировать гистоны.

Интересным применением направленной регуляции транскрипции с помощью TALE-TF является создание генетических логических контуров внутри клетки, основанных на взаимодействии нескольких TALE-TF с промоторами друг друга и репортерным геном, и промоторов факторов, регулирующих экспрессию. С помощью этого подхода внутри клеток созданы логические контуры НЕ-ИЛИ [167] и И [168].

Каталитически неактивная dCas9 или dCas9, к которой присоединены факторы, регулирующие экспрессию генов, также позволяет активировать или репрессировать транскрипцию в клетках человека, бактерий и дрожжей [112–116]. С этой целью можно использовать омега-субъединицу РНК-полимеразы *E. coli* [113], тандемные копии вирусного белка VP64, KRAB-домен [112, 115]. Так, удалось обеспечить высокоспецифичный сайленсинг генов *CD71* и *CXCR4* (на уровне 60–80%), а также эффективный нокдаун локуса *TEF1* у дрожжей [112]. Более того, получена мультиплексная активация/репрессия промоторов нескольких генов, причем тип регуляции (положительная или отрицательная) определяется положением мишени в промоторе гена [114, 115]. Таким образом, система CRISPR/Cas9 может использоваться как модульная платформа, связывающаяся с заданной нуклеотидной последовательностью и привлекающая к ней белковые факторы, тем самым открывая возможности использования этой системы как основного метода точной регуляции экспрессии генов в клетках эукариот.

Визуализация внутренних локусов генома с помощью систем TALE и CRISPR/Cas9

Известно, что организация и динамика хроматина играют определяющую роль в регуляции функционирования генома. Однако чрезвычайно трудно получить визуальное изображение функциональных локусов генома в живых клетках. Использование систем TALE и CRISPR/Cas9 открывает новые возможности в решении этой проблемы.

С помощью конструкций, содержащих ДНК-связывающий домен TALE и флуоресцентный бе-

лок, удалось визуализировать целевые ДНК в динамике [169–171]. Этот подход позволяет изучать пространственно-временную организацию повторенных элементов генома, в том числе центромерных и теломерных повторов.

С помощью эндонуклеазодефицитного белка Cas9, меченного EGFP, и структурно оптимизированных sgRNA разработан метод визуализации повторяющихся элементов в теломерах и кодирующих генов в живых клетках [117]. На опухолевых клеточных линиях RPE, HeLa и UMUC3 удалось визуализировать повторяющиеся и неповторяющиеся элементы в генах *MUC4* и *MUC1*, ответственных за выработку различных форм муцина, одного из компонентов защитной слизи в различных эпителиальных тканях и важного при малигнизации [117]. Таким образом, появляется возможность проводить мониторинг количества копий генов в живой клетке. С использованием этого метода наблюдали динамику процессов элонгации и разрушения теломер, субъядерную локализацию локусов *MUC4*, когезию реплицированных локусов *MUC4* на сестринских хроматидах и их изменяющееся поведение в течение митоза [117]. Такая стратегия обладает значительным потенциалом для изучения конформации и динамики нативных хромосом в живых клетках человека.

Химерные рекомбиназы и транспозазы как альтернатива TALEN

Рекомбиназы и транспозазы представляют собой альтернативу TALEN при редактировании генома. К их преимуществам относится отсутствие зависимости от внутриклеточных механизмов репарации. Эти ферменты также производят разрезание и лигирование в целевых сайтах, и соответственно при этом не происходит накопления двухцепочечных разрывов, которые могут привести к гибели клеток. Вдобавок рекомбиназы и транспозазы встраивают донорную ДНК в геном, что упрощает детекцию их активности. Недостатком этих химерных ферментов является достаточно высокий уровень нецелевых эффектов [172]. В качестве эффекторного домена используют каталитический домен рекомбиназы Gin [173, 174] или транспозазы piggyBac [175]. Активность TALE-рекомбиназ показана с помощью репортерного гена, промотор которого специфически вырезался рекомбиназой Gin. Возможность редактирования генома с использованием транспозазы показана на примере локуса *CCR5*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка систем TALEN и CRISPR/Cas9 является важной ступенью в развитии современной геномной инженерии. Появление этих систем, благодаря

их дешевизне и простоте конструирования, стало мощным толчком для развития как фундаментальной, так и прикладной науки. Перспективы применения этих систем в самых различных областях, начиная с пищевой промышленности и заканчивая персонализированной медициной, действительно невероятны. Однако до сих пор остаются открытыми некоторые вопросы, связанные со специфичностью и безопасностью их использования (из-за возможных нецелевых эффектов), способами доставки при терапевтическом применении, а также нет ответа на вопрос: какая из этих систем сочетает в себе наибольшую эффективность и безопасность?

Использование системы CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ перед методами, основанными на ZFN и TALEN: ее значительно проще создать, она обладает более высокой эффективностью и подходит для высокопроизводительного и мультиплексного редактирования генома в самых разных клеточных линиях и живых организмах. Для переориентации на новую мишень нужно только поменять 20-нуклеотидную направляющую последовательность sgRNA. Причем Cas9 вносит разрыв строго между 17-м и 18-м нуклеотидами в целевой последовательности (считая от 5'-конца спейсера), т.е. на расстоянии трех нуклеотидов от PAM. А одновременное редактирование нескольких генов значительно упрощается введением комбинации sgRNA. Использование никазы и модификация конструкции sgRNA для более точного узнавания мишени в геноме позволяет избежать нежелательных нецелевых эффектов.

Система TALEN более трудоемкая, она требует больше времени на конструирование, чем CRISPR/Cas9. Однако сейчас существуют методы автоматизированного создания конструкций, экспрессирующих TALEN, что позволяет получать их эффективно в коммерческом масштабе. При этом тот факт, что TALEN вносят разрывы только при димеризации домена FokI, т.е. парами, увеличивает специфичность и снижает риск нецелевых эффектов.

На сегодняшний день не существует однозначного ответа на вопрос, какую из систем использовать. Необходимо детальное сравнение обеих систем, каждая из которых обладает своими особенностями. Не исключено, что универсальный ответ на этот вопрос так и не будет найден, и для каждого конкретного случая нужно будет пробовать различные варианты и выбирать из них наиболее соответствующие поставленным целям. ●

Работа поддержана междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 55, РФФИ (грант № 12-04-00208-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sapecchi M.R. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 6. P. 507–512.
2. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 3. P. 1156–1160.
3. Bibikova M., Golic M., Golic K.G., Carroll D. // *Genetics.* 2002. V. 161. № 3. P. 1169–1175.
4. Townsend J.A., Wright D.A., Winfrei R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K., Voytas D.F. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7245. P. 442–445.
5. Zhang F., Maeder M.L., Unger-Wallace E., Hoshaw J.P., Reyon D., Christian M., Li X., Pierick C.J., Dobbs D., Peterson T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 26. P. 12028–12033.
6. Torikai H., Reik A., Liu P.Q., Zhou Y., Zhang L., Maiti S., Huls H., Miller J.C., Kebriaei P., Rabinovitch B., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 24. P. 5697–5705.
7. Provasi E., Genovese P., Lombardo A., Magnani Z., Liu P.Q., Reik A., Chu V., Paschon D.E., Zhang L., Kuball J., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 5. P. 807–815.
8. Lombardo A., Cesana D., Genovese P., Di Stefano B., Provasi E., Colombo D.F., Neri M., Magnani Z., Cantore A., Lo Riso P., et al. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. № 10. P. 861–869.
9. Becker M. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 1. P. 1.
10. Schornack S., Meyer A., Römer P., Jordan T., Lahaye T. // *J. Plant Physiol.* 2006. V. 163. № 3. P. 256–272.
11. Romer P., Hahn S., Jordan T., Strauss T., Bonas U., Lahaye T. // *Science.* 2007. V. 318. № 5850. P. 645–648.
12. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstandt A., Bonas U., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5959. P. 1509–1512.
13. Moscou M.J., Bogdanove A.J. // *Science.* 2009. V. 326. № 5959. P. 1501.
14. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 21. P. 9779–9785.
15. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Genetics.* 2010. V. 186. № 2. P. 757–761.
16. Cong L., Zhou R., Kuo Y.C., Cunniff M.M., Zhang F. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 968.
17. Christian M.L., Demorest Z.L., Starker C.G., Osborn M.J., Nyquist M.D., Zhang Y., Carlson D.F., Bradley P., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 9. e45383.
18. Streubel J., Blucher C., Landgraf A., Boch J. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 7. P. 593–595.
19. Mak A.N., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L. // *Science.* 2012. V. 335. № 6069. P. 716–719.
20. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 2. P. 5429–5433.
21. Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E. // *PLoS Comput. Biol.* 2005. V. 1. № 6. e60.
22. Bolotin A., Quinguis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 2551–2561.
23. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. // *J. Mol. Evol.* 2005. V. 60. № 2. P. 174–182.
24. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 653–663.
25. Barrangou R., Flemaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. // *Science.* 2007. V. 315. № 5819. P. 1709–1712.
26. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. P. 172.
27. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y.I., Yakunin A.F., et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. № 6. P. 467–477.
28. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Almendros C. // *Microbiology.* 2009. V. 155. P. 733–740.
29. Swarts D.C., Mosterd C., van Passel M.W., Brouns S.J. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. e35888.
30. Hale C.R., Majumdar S., Elmore J., Pfister N., Compton M., Olson S., Resch A.M., Glover C.V., Graveley B.R., Tern R.M. // *Mol. Cell.* 2012. V. 45. № 3. P. 292–302.
31. Lillestol R.K., Shah S.A., Brugger K., Redder P., Phan H., Christiansen J., Garrett R.A. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 72. № 1. P. 259–272.
32. Carte J., Wang R., Li H., Terns R.M., Terns M.P. // *Genes. Dev.* 2008. V. 22. № 24. P. 3489–3496.
33. Haurwitz R.E., Jinek M., Wiedenheft B., Zhou K., Doudna J.A. // *Science.* 2010. V. 329. № 5997. P. 1355–1358.
34. Gesner E.M., Schellenberg M.J., Garside E.L., George M.M., Macmillan A.M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 6. P. 688–692.
35. Richter H., Zoepfel J., Schermuly J., Maticzka D., Backofen R., Randau L. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 19. P. 9887–9896.
36. Sashital D.G., Jinek M., Doudna J.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 6. P. 680–687.
37. Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Terns R.M., Terns M.P. // *Cell.* 2009. V. 139. № 5. P. 945–956.
38. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. // *Biol. Direct.* 2006. V. 1. P. 7.
39. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. // *Nature.* 2010. V. 463. № 7280. P. 568–571.
40. Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K.L., Davidson A.R. // *Nature.* 2013. V. 493. № 7432. P. 429–432.
41. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Koonin E.V. // *Biol. Direct.* 2011. V. 6. P. 38.
42. Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 21. P. 9275–9282.
43. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science.* 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
44. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. // *Nature.* 2011. V. 471. № 7340. P. 602–607.
45. Mussolino C., Cathomen T. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012. V. 23. № 5. P. 644–650.
46. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
47. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 9. P. 827–832.
48. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 3. P. 233–239.
49. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 9. P. 822–826.
50. Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 9. P. 833–838.
51. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y. // *Cell.* 2013. V. 154. № 6. P. 1380–1389.
52. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 39. P. 2579–2586.
53. Dianov G.L., Hubscher U. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 6. P. 3483–3490.
54. Doyle E.L., Booher N.J., Standage D.S., Voytas D.F., Brendel V.P., Vandyk J.K., Bogdanove A.J. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. W117–122.

55. Fine E.J., Cradick T.J., Zhao C.L., Lin Y., Bao G. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 42. № 6. e42.
56. Grau J., Boch J., Posch S. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 22. P. 2931–2932.
57. Grau J., Wolf A., Reschke M., Bonas U., Posch S. // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. № 3. e1002962.
58. Heigwer F., Kerr G., Walther N., Glaeser K., Pelz O., Breinig M., Boutros M. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 20. e190.
59. Neff K.L., Argue D.P., Ma A.C., Lee H.B., Clark K.J., Ekker S.C. // *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 1.
60. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. W52–57.
61. Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 24. P. 3317–3318.
62. Xiao A., Cheng Z., Kong L., Zhu Z., Lin S., Gao G., Zhang B. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 8. P. 1180–1182.
63. Sander J.D., Cade L., Khayter C., Reyon D., Peterson R.T., Joung J.K., Yeh J.R. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 8. P. 697–698.
64. Reyon D., Khayter C., Regan M.R., Joung J.K., Sander J.D. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2012. C.12. U. 12.15.
65. Weber E., Engler C., Gruetznern R., Werner S., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. e16765.
66. Engler C., Gruetznern R., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 5. e5553.
67. Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G.M., Arlotta P. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 2. P. 149–153.
68. Sanjana N.E., Cong L., Zhou Y., Cunniff M.M., Feng G., Zhang F. // *Nat. Protoc.* 2012. V. 7. № 1. P. 171–192.
69. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Honing K., Hornung V. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 1. P. 76–81.
70. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 12. e82.
71. Ding Q., Lee Y.K., Schaefer E.A., Peters D.T., Veres A., Kim K., Kuperwasser N., Motola D.L., Meissner T.B., Hendriks W.T. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 2. P. 238–251.
72. Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D., Joung J.K. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 5. P. 460–465.
73. Briggs A.W., Rios X., Chari R., Yang L., Zhang F., Mali P., Church G.M. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 15. e117.
74. Wang Z., Li J., Huang H., Wang G., Jiang M., Yin S., Sun C., Zhang H., Zhuang F., Xi J.J. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51. № 34. P. 8505–8508.
75. Jinek M., Doudna J.A. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7228. P. 405–412.
76. Malone C.D., Hannon G.J. // *Cell.* 2009. V. 136. № 4. P. 656–668.
77. Meister G., Tuschl T. // *Nature.* 2004. V. 431. № 7006. P. 343–349.
78. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 3. P. 230–232.
79. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. // *Elife.* 2013. V. 2. e00471.
80. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
81. Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X., Zhu X., Xiong J.W., Xi J.J. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 4. P. 465–472.
82. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.R., Joung J.K. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 3. P. 227–229.
83. Wang H., Yang H., Shivalia S.C., Dawlaty M.M., Cheng W.A., Zhang F., Jaenisch R. // *Cell.* 2013. V. 153. № 4. P. 910–918.
84. Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., Shi X., Scott D.A., Mikkelsen T.S., Heckl D., Ebert B.L., Root D.E., Doench J.G. // *Science.* 2014. V. 343. № 6166. P. 84–87.
85. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. // *Science.* 2014. V. 343. № 6166. P. 80–84.
86. Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.L. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 686–688.
87. Mao Y., Zhang H., Xu N., Zhang B., Gao F., Zhu J.K. // *Mol. Plant.* 2013. V. 6. № 6. P. 2008–2011.
88. Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 688–691.
89. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 691–693.
90. Lieber M.R. // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 181–211.
91. Ousterout D.G., Perez-Pinera P., Thakore P.I., Kabadi A.M., Brown M.T., Qin X., Fedrigo O., Mouly V., Tremblay J.P., Gersbach C.A. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 9. P. 1718–1726.
92. Kim H., Um E., Cho S.R., Jung C., Kim H., Kim J.S. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. № 11. P. 941–943.
93. Guschin D.Y., Waite A.J., Katibah G.E., Miller J.C., Holmes M.C., Rebar E.J. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 649. P. 247–256.
94. Dahlem T.J., Hoshijima K., Juryne M.J., Gunther D., Starker C.G., Locke A.S., Weis A.M., Voytas D.F., Grunwald D.J. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 8. e1002861.
95. Ota S., Hisano Y., Muraki M., Hoshijima K., Dahlem T.J., Grunwald D.J., Kawahara A. // *Genes Cells.* 2013. V. 18. № 6. P. 450–458.
96. Kim H.J., Lee H.J., Kim H., Cho S.W., Kim J.S. // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 7. P. 1279–1288.
97. Hisano Y., Ota S., Arakawa K., Muraki M., Kono N., Oshita K., Sakuma T., Tomita M., Yamamoto T., Okada Y. // *Biol. Open.* 2013. V. 2. № 4. P. 363–367.
98. Yang L., Guell M., Byrne S., Yang J.L., De Los Angeles A., Mali P., Aach J., Kim-Kiselak C., Briggs A.W., Rios X. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 19. P. 9049–9061.
99. Saleh-Gohari N., Helleday T. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 12. P. 3683–3688.
100. Perez E.E., Wang J., Miller J.C., Jouvenot Y., Kim K.A., Liu O., Wang N., Lee G., Bartsevich V.V., Lee Y.L. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 808–816.
101. Cristea S., Freyvert Y., Santiago Y., Holmes M.C., Urnov F.D., Gregory P.D., Cost G.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. V. 110. № 3. P. 871–880.
102. Maresca M., Lin V.G., Guo N., Yang Y. // *Genome Res.* 2013. V. 23. № 3. P. 539–546.
103. Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Taunton J., Collinwood T.N., Frodin M., Davis G.D. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. № 9. P. 753–755.
104. Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Jouvenot Y., DeKolver R.C., Gregory P.D., Urnov F.D., Holmes M.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 9. P. 3055–3060.
105. Orlando S.J., Santiago Y., DeKolver R.C., Freyvert Y., Boydston E.A., Moehle E.A., Choi V.M., Gopalan S.M., Lou J.F., Li J. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. № 15. e152.
106. Hu R., Wallace J., Dahlem T.J., Grunwald D.J., O'Connell R.M. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. e63074.
107. Bloom K., Ely A., Mussolino C., Cathomen T., Arbuthnot P. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 10. P. 1889–1897.
108. Schiffer J.T., Aubert M., Weber N.D., Mintzer E., Stone D., Jerome K.R. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 17. P. 8920–8936.
109. Holt N., Wang J., Kim K., Friedman G., Wang X., Taupin V., Crooks G.M., Kohn D.B., Gregory P.D., Holmes M.C. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 839–847.
110. Horii T., Tamura D., Morita S., Kimura M., Hatada I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 10. P. 19774–19781.

111. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., van der Ent C.K. // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 13. № 6. P. 653–658.
112. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A. // *Cell*. 2013. V. 154. № 2. P. 442–451.
113. Bikard D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L.A. // *Nucleic Acids Res*. 2013. V. 41. № 15. P. 7429–7437.
114. Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M., Adler A.F., Kabadi A.M., Polstein L.R., Thakore C.A. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 10. P. 973–976.
115. Farzadfard F., Perli S.D., Lu T.K. // *ACS Synth. Biol*. 2013. V. 2. № 10. P. 604–613.
116. Heintze J., Luft C., Ketteler R. // *Front Genet*. 2013. V. 4. P. 193.
117. Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., et al. // *Cell*. 2013. V. 155. № 7. P. 1479–1491.
118. Smith J.R., Maguire S., Davis L.A., Alexander M., Yang F., Chandran S., ffrench-Constant C., Pedersen R.A. // *Stem Cells*. 2008. V. 26. № 2. P. 496–504.
119. Chiu H., Schwartz H.T., Antoshechkin I., Sternberg P.W. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 1167–1171.
120. Cho S.W., Lee J., Carroll D., Kim J., Lee J. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 1177–1180.
121. Katic I., Grosshans H. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 1173–1176.
122. Lo T.W., Pickle C.S., Lin S., Ralston E.J., Gurling M., Schartner C.M., Bian Q., Doudna J.A., Meyer B.J. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 2. P. 331–348.
123. Tzur Y.B., Friedland A.E., Nadarajan S., Church G.M., Calarco J.A., Colaiácovo M.P. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 1181–1185.
124. Waaijers S., Portegijs V., Kerver J., Lemmens B.B., Tijsterman M., van den Heuvel S., Boxem M. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 11887–11891.
125. Dickinson D.J., Ward J.D., Reiner D.J., Goldstein B. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 10. P. 1028–1034.
126. Friedland A.E., Tzur Y.B., Esvelt K.M., Colaiácovo M.P., Church G.M., Calarco J.A. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 8. P. 741–743.
127. Maggert K.A., Gong W.J., Golic K.G. // *Methods Mol. Biol*. 2008. V. 420. P. 155–174.
128. Rong Y.S., Golic K.G. // *Science*. 2000. V. 288. № 5473. P. 2013–2018.
129. Venken K.J., Bellen H.J. // *Nat. Rev. Genet*. 2005. V. 6. № 3. P. 167–178.
130. Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J. // *Cell Rep*. 2013. V. 4. № 1. P. 220–228.
131. Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K., Harrison M.M., Wildonger J., O'Connor-Giles K.M. // *Genetics*. 2013. V. 194. № 4. P. 1029–1035.
132. Yu Z., Ren M., Wang Z., Zhang B., Rong Y.S., Jiao R., Gao G. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 1. P. 289–291.
133. Ren X., Sun J., Housden B.E., Hu Y., Roesel C., Liu L.P., Yang Z., Mao D., Sun L., Wu Q., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 47. P. 19012–19017.
134. Seth A., Stemple D.L., Barroso I. // *Dis. Model. Mech*. 2013. V. 6. № 5. P. 1080–1088.
135. Copeland N.G., Jenkins N.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. № 10. P. 696–706.
136. Kool J., Berns A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2009. V. 9. № 6. P. 389–399.
137. Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Science*. 2011. V. 333. № 6051. P. 1843–1846.
138. Carroll D., Beumer K.J., Morton J.J., Bozas A., Trautman J.K. // *Methods Mol. Biol*. 2008. V. 435. P. 63–77.
139. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. // *Nat. Rev. Genet*. 2010. V. 11. № 9. P. 636–646.
140. Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L., Cui X. // *Genetics*. 2010. V. 186. № 2. P. 451–459.
141. Geurts A.M., Cost G.J., Freyvert Y., Zeitler B., Miller J.C., Choi V.M., Jenkins S.S., Wood A., Cui X., Meng X., et al. // *Science*. 2009. V. 325. № 5939. P. 433.
142. Cui X., Ji D., Fisher D.A., Wu Y., Briner D.M., Weinstein E.J. // *Nat. Biotechnol*. 2011. V. 29. № 1. P. 64–67.
143. Meyer M., de Angelis M.H., Wurst W., Kuhn R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 34. P. 15022–15026.
144. Li D., Qiu Z., Shao Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zao Y., et al. // *Nat. Biotechnol*. 2013. V. 31. № 8. P. 681–683.
145. Li W., Teng F., Li T., Zhou Q. // *Nat. Biotechnol*. 2013. V. 31. № 8. P. 684–686.
146. Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 13. № 6. P. 659–662.
147. Chen K., Gao C. // *J. Genet. Genomics*. 2013. V. 40. № 6. P. 271–279.
148. van der Hoorn R.A., Laurent F., Roth R., De Wit P.J. // *Mol. Plant. Microbe Interact*. 2000. V. 13. № 4. P. 439–446.
149. Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y., et al. // *Cell Res*. 2013. V. 23. № 10. P. 1229–1232.
150. Xie K., Yang Y. // *Mol. Plant*. 2013. V. 6. № 6. P. 1975–1983.
151. Miao J., Guo D., Zhang J., Huang Q., Qin G., Zhang X., Wan J., Gu H., Qu L. // *Cell Res*. 2013. V. 23. № 10. P. 1233–1236.
152. Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. // *Nucleic Acids Res*. 2013. V. 41. № 20. e188.
153. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. // *G3 (Bethesda)*. 2013. V. 3. № 12. P. 2233–2238.
154. Shan Q., Wang Y., Chen K., Liang Z., Li J., Zhang Y., Zhang K., Liu J., Voytas D.F., Zheng X. // *Mol. Plant*. 2013. V. 6. № 4. P. 1365–1368.
155. Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. // *Nat. Biotechnol*. 2012. V. 30. № 5. P. 390–392.
156. Zhang Y., Zhang F., Li X., Baller J.A., Starker C.G., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Plant Physiol*. 2013. V. 161. № 1. P. 20–27.
157. Mahfouz M.M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X., Zhu J.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 6. P. 2623–2628.
158. Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B., Barbas C.F. 3rd. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 25. P. 14628–14633.
159. Perez-Pinera P., Ousterout D.G., Brunger J.M., Farin A.M., Guilak F., Crawford G.E., Hartemink A.J., Gersbach C.A. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 3. P. 239–242.
160. Maeder M.L., Linder S.J., Reyon D., Angstman J.F., Fu Y., Sander J.D., Joung J.K. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 3. P. 243–245.
161. Li Y., Moore R., Guinn M., Bleris L. // *Sci. Rep*. 2012. V. 2. P. 897.
162. Mahfouz M.M., Li L., Piatek M., Fang X., Mansour H., Bangarusamy D.K., Zhu J.K. // *Plant Mol. Biol*. 2012. V. 78. № 3. P. 311–321.
163. Chapdelaine P., Coulombe Z., Chikh A., Gerard C., Tremblay J.P. // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2013. V. 2. e119.
164. Gao X., Yang J., Tsang J.C., Ooi J., Wu D., Liu P. // *Stem Cell Reports*. 2013. V. 1. № 2. P. 183–197.
165. Mercer A.C., Gaj T., Sirk S.J., Lamb B.M., Barbas C.F. 3rd. // *ACS Synth. Biol*. 2013.

166. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang F. // *Nature*. 2013. V. 500. № 7463. P. 472–476.
167. Gaber R., Lebar T., Majerle A., Ster B., Dobnikar A., Bencina M., Jerala R. // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10. № 3. P. 203–208.
168. Lienert F., Torella J.P., Chen J.H., Norsworthy M., Richardson R.R., Silver P.A. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 21. P. 9967–9975.
169. Miyanari Y., Ziegler-Birling C., Torres-Padilla M.E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 11. P. 1321–1324.
170. Thanisch K., Schneider K., Morbitzer R., Solovei I., Lahaye T., Bultmann S., Leonhardt H. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 42. № 6. e38.
171. Ma H., Reyes-Gutierrez P., Pederson T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 52. P. 21048–21053.
172. Owens J.B., Urschitz J., Stoytchev I., Dang N.C., Stoytcheva Z., Belcaid M., Maragathavally K.J., Coates C.J., Segal D.J., Moisyadi S. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 14. P. 6978–6991.
173. Mercer A.C., Gaj T., Fuller R.P., Barbas C.F., 3rd. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 21. P. 11163–11172.
174. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F., 3rd. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 21. P. 9779–9785.
175. Owens J.B., Mauro D., Stoytchev I., Bhakta M.S., Kim M.S., Segal D.J., Moisyadi S. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 19. P. 9197–9207.
176. Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 2. P. 143–148.
177. Mussolino C., Morbitzer R., Lutge F., Dannemann N., Lahaye T., Cathomen T. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 21. P. 9283–9293.
178. Sun N., Liang J., Abil Z., Zhao H. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. № 4. P. 1255–1263.
179. Xu L., Zhao P., Mariano A., Han R. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013. V. 2. e112.
180. Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C.S., Gao Q., Cassady J.P., Cost G.J., Zhang L., Santiago Y., Miller J.C., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 8. P. 731–734.
181. Li T., Huang S., Zhao X., Wright D.A., Carpenter S., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 14. P. 6315–6325.
182. Wood A.J., Lo T.W., Zeitler B., Pickle C.S., Ralston E.J., Lee A.H., Amora R., Miller J.C., Leung E., Meng X., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6040. P. 307.
183. Liu J., Li C., Yu Z., Huang P., Wu H., Wei C., Zhu N., Chen Y., Zhang B., Deng W.M., et al. // *J. Genet. Genomics.* 2012. V. 39. № 5. P. 209–215.
184. Bedell V.M., Wang Y., Campbell J.M., Poshusta T.L., Starker C.G., Krug R.G. 2nd, Tan W., Penheiter S.G., Ma A.C., Leung A.Y., et al. // *Nature*. 2012. V. 491. № 7422. P. 114–118.
185. Moore F.E., Reyon D., Sander J.D., Martinez S.A., Blackburn J.S., Khayter C., Ramirez C.L., Joung J.K., Langenau D.M. // *PLoS One*. 2012. P. 7. № 5. e37877.
186. Huang P., Xiao A., Zhou M., Zhu Z., Lin S., Zhang B. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 8. P. 699–700.
187. Cade L., Reyon D., Hwang W.Y., Tsai S.Q., Patel S., Khayter C., Joung J.K., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.R. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 16. P. 8001–8010.
188. Ma S., Zhang S., Wang F., Liu Y., Liu Y., Xu H., Liu C., Lin Y., Zhao P., Xia Q. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 9. e45035.
189. Watanabe T., Ochiai H., Sakuma T., Horch H.W., Hamaguchi N., Nakamura T., Bando T., Ohuchi H., Yamamoto T., Noji S., et al. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1017.
190. Lei Y., Guo X., Liu Y., Cao Y., Deng Y., Chen X., Cheng X., Cheng C.H., Dawid I.B., Chen Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 43. P. 17484–17489.
191. Panda S.K., Wefers B., Ortiz O., Floss T., Schmid B., Haass C., Wurst W., Kuhn R. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 703–713.
192. Qiu Z., Liu M., Chen Z., Shao Y., Pan H., Wei G., Yu C., Zhang L., Li X., Wang P., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 11. e120.
193. Wu J., Huang Z., Ren J., Zhang Z., He P., Li Y., Ma J., Chen W., Zhang Y., Zhou X., et al. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 8. P. 994–1006.
194. Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 1. P. 23–24.
195. Wefers B., Meyer M., Ortiz O., Hrabe de Angelis M., Hansen J., Wurst W., Kuhn R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 10. P. 3782–3787.
196. Davies B., Davies G., Preece C., Puliyadi R., Szumska D., Bhattacharya S. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 3. e60216.
197. Tong C., Huang G., Ashton C., Wu H., Yan H., Ying Q.L. // *J. Genet. Genomics.* 2012. V. 39. № 6. P. 275–280.
198. Tesson L., Usal C., Menoret S., Leung E., Niles B.J., Remy S., Santiago Y., Vincent A.I., Meng X., Zhang L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 8. P. 695–696.
199. Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G., Stverakova D., Proudfoot C., Christian M., Voytas D.F., Long C.R., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 43. P. 17382–17387.
200. DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 7. P. 4336–4343.
201. Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L., Sontheimer E.J., Thomson J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 39. P. 15644–15649.
202. Ding Q., Regan S.N., Xia Y., Oostrom L.A., Cowan C.A., Musunuru K. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 4. P. 393–394.
203. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.J. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. e68708.
204. Jao L.E., Wente S.R., Chen W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 34. P. 13904–13909.
205. Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P., Tong X., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 14. e141.
206. Hruscha A., Krawitz P., Rechenberg A., Heinrich V., Hecht J., Haass C., Schmid B. // *Development*. 2013. V. 140. № 24. P. 4982–4987.
207. Nakayama T., Fish M.B., Fisher M., Oomen-Hajagos J., Thomsen G.H., Grainger R.M. // *Genesis*. 2013. V. 51. № 12. P. 835–843.
208. Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A., Garbe J.R., Webster D.A., Hackett P.B., Fahrenkrug S.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 41. P. 16526–16531.
209. Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 20. e187.
210. Shen B., Zhang J., Wu H., Wang J., Ma K., Li Z., Zhang X., Zhang P., Huang X. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 5. P. 720–723.
211. Ma Y., Zhang X., Shen B., Lu Y., Chen W., Ma J., Bai L., Huang X., Zhang L. // *Cell Res.* 2014. V. 24. № 1. P. 122–125.

УДК 579.8.05

Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов

В. М. Чернов^{1,2}, О. А. Чернова^{1,2}, Х. Т. Санчес-Вега³, А. И. Колпаков^{2*}, О. Н. Ильинская²¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18³Национальный автономный университет Мексики, Койокаян, 04510, Мексика

E-mail: ljoscha@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2014

РЕФЕРАТ Клеточные культуры подвержены контаминации как клетками других культур, так и микроорганизмами, включая грибы, вирусы, бактерии. Особое значение имеет контаминация клеточных культур микоплазмами. Поскольку культуры клеток используются для получения вакцин и физиологически активных соединений, разработка системы контроля контаминации актуальна как для фундаментальной науки, так и для биотехнологических производств. Обнаружение у микоплазм внеклеточных мембранных везикул диктует необходимость учета везикулярного трафика бактерий в системе контроля инфектогенов. Внеклеточные везикулы бактерий опосредуют трафик белков и генов, участвуют в межклеточных взаимодействиях, патогенезе и развитии резистентности к антибактериальным препаратам. В обзоре рассмотрены особенности микоплазм и их внеклеточных везикул, а также взаимодействие контаминантов с клетками эукариот, проанализированы проблемы современных способов диагностики, эрадикации микоплазменной контаминации клеточных культур и перспективы их решения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диагностика и эрадикация, клеточные культуры, микоплазменная контаминация.

ВВЕДЕНИЕ

Активное использование клеточных культур в фундаментальных исследованиях и биотехнологическом производстве делает необходимым разработку системы строгого контроля контаминации материалов. При работе с клеточными культурами всегда существует риск их контаминации как эукариотическими клетками других культур, так и микроорганизмами, включая грибы, вирусы, бактерии. Особое значение имеет контаминация микоплазмами, которая визуалью никак не проявляется [1–3].

В 1956 году Робинсон с сотрудниками инфицировали клеточные культуры микоплазмами с целью выяснения влияния этих организмов на эукариотические клетки. В процессе исследования было установлено, что исходная клеточная культура уже была заражена микоплазмой. Эти данные легли в основу первого сообщения о микоплазменной контаминации клеточных культур [4], а в дальнейшем очевидным стало то, что микоплазменная контаминация – бич клеточных культур. Оказалось, что клеточные культуры всех

типов, ведущие свое происхождение от различных эукариотических организмов (млекопитающие, птицы, рептилии, рыбы, насекомые и растения), подвержены контаминации микоплазмами. По результатам экспериментальных работ, проведенных в разных странах мира, пораженность культур микоплазмами в различных лабораториях варьирует от 15 до 80%; в некоторых достигает 100% [3, 5].

Микоплазмы – собирательное название представителей класса Mollicutes, мельчайших, лишенных клеточной стенки бактерий, способных к самостоятельному воспроизведению. Малый размер генома определяет ограниченные биосинтетические возможности этих микроорганизмов и соответственно паразитический образ жизни. Большой интерес к микоплазмам сегодня связан, с одной стороны, с изучением молекулярных закономерностей «логики жизни» минимальной клетки, а с другой – диктуется практической необходимостью. Микоплазмы – паразиты человека, животных, растений, причем некоторые из них являются возбудителями социально

значимых заболеваний, основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему, решение которой связывают с выяснением молекулярных механизмов адаптации, определяющих выживание микоплазм в различных условиях, преодоление ими защитных систем высших эукариот и персистенцию [1–3, 6–8].

МИКОПЛАЗМЫ – ОСНОВНЫЕ КОНТАМИНАНТЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Значительный объем теоретических и практических данных, полученных за последние годы, коренным образом изменил представления о патогенности микоплазм. Стало ясно, что эти бактерии выработали изощренные механизмы для выживания в экстремальных условиях и реализации вирулентности [9–18], а условия культивирования *in vitro* клеток эукариот благоприятны для роста микоплазм [1–3, 19]. Помимо исходных организмов, клетки тканей которых были переведены в культуры *in vitro*, источниками микоплазменной контаминации могут быть сами исследователи, компоненты сред и лабораторное оборудование. В связи с этим все представители

класса Mollicutes являются потенциальными контаминантами клеточных культур. На сегодняшний день в клеточных культурах выявлено около трех десятков видов микоплазм, при этом почти в 95% случаев это шесть видов – *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae*, *M. orale* и *Acholeplasma laidlawii* [2, 3]. Это позволяет предполагать, что данные бактерии обладают особыми свойствами, определяющими доминирование в соответствующей экосистеме, а решение проблемы контроля микоплазменной контаминации лежит в области механизмов их адаптации.

Уникальным по своим адаптивным свойствам видом микоплазмы представляется *A. laidlawii*. Эта широко распространенная в природе микоплазма является возбудителем фитомикоплазмозов [1, 20, 21]. Она обнаруживается у человека и животных при различных патологических процессах, однако, строгие доказательства патогенности этой бактерии пока отсутствуют [1, 3, 5]. Расшифровка генома *A. laidlawii*, выполненная в России [22], определила возможность применения постгеномных технологий для выявления механизмов адаптации этой микоплазмы. В результате геномно-транскриптомно-протеомного профилиро-



Рис. 1. Внеклеточные везикулы опосредуют трафик широкого спектра компонентов, перенос детерминант вирулентности и формирование резистентности к антибактериальным препаратам, участвуют в передаче сигналов, межклеточных взаимодействиях и патогенезе [41]

вания и наноскопического анализа были идентифицированы стресс-реактивные белки и гены *A. laidlawii*. Показано, что механизмы выживания микоплазмы в неблагоприятных условиях, а также формирования системы паразит-хозяин и реализации вирулентности связаны с секрецией этой бактерией внеклеточных мембранных везикул [16, 20, 21, 23, 24].

Внеклеточные мембранные везикулы опосредуют универсальный способ секреции у про- и эукариот и представляют собой важнейшую часть бактериального секрета [25]. Помимо мембранных компонентов они могут содержать цитоплазматические белки, токсины, а также ДНК и РНК [26, 27]. Обнаруженные несколько десятилетий назад у грамотрицательных бактерий [26] внеклеточные везикулы недавно выявили у архей [28], грамположительных бактерий [29] и у мельчайших бесстеночных прокариот – микоплазм [16, 24]. Было установлено, что везикулы, как переносчики эссенциальной клеточно-специфичной информации, играют важную роль в межклеточной коммуникации [25, 30–32]. Интернализация этих наноструктур определяет репрограммирование клеток-мишеней, которое регистрируется при протеомном и транскриптомном анализе [33, 34]. Внеклеточные везикулы, секретруемые клетками бактерий, опосредуют белковый трафик и перенос детерминант вирулентности, участвуют в формировании системы паразит-хозяин, а также резистентности к антибактериальным препаратам и соответственно в адаптации к различным условиям среды (рис. 1) [25, 27]. В соответствии с критериями вирулентности внеклеточные везикулы патогенных бактерий представляют новый тип инфектогенов, что определяет необходимость коррекции подходов к решению проблем контроля бактериальных инфекций [21, 31, 35].

Показано, что клетки микоплазмы *A. laidlawii* секретрируют во внеклеточную среду везикулы (диаметр 20–120) в различных условиях роста, однако в стрессовых условиях уровень образования везикул существенно возрастает (рис. 2). Везикулы определяют такие вирулентные свойства микоплазмы, как инфекционность, инвазивность и токсигенность, индуцируют кластогенный эффект в отношении эукариотических клеток *in vitro* (рис. 3). Проникновение везикул предшествует проникновению клеток микоплазмы в ткани растений и вызывает нарушение их ультраструктуры, индуцирует модуляцию экспрессии генов и синтеза белков инфицированных организмов, опосредует развитие резистентности микоплазмы к антибактериальным препаратам [16, 20, 21, 24, 36]. В результате глобального протеомного профилирования проведена «инвентаризация» белков внеклеточных везикул *A. laidlawii* PG8, секре-

тируемых в аксеничной культуре [37]. Оказалось, что значительная часть полипептидов, экспортируемых из клеток микоплазмы в составе везикулярных структур, это факторы вирулентности, в том числе адгезины и ферменты деградации белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот (рис. 4).

Помимо мембранных компонентов и цитоплазматических белков, внеклеточные везикулы *A. laidlawii* PG8 содержат специфичный набор нуклеотидных последовательностей ДНК, которые могут использоваться в качестве маркеров бактериальных везикул в анализируемых образцах [20, 24, 36]. Сходные данные по структуре и составу внеклеточных везикул получены также для *M. gallisepticum* (рис. 2) – широко распространенного возбудителя заболеваний птиц и основного контаминанта вирусных вакцин, создаваемых на основе куриных эмбрионов [24]. Полученные результаты свидетельствуют, что везикулярный трафик, ассоциированный с внеклеточными мембранными везикулами у архей, классических грамположительных и грамотрицательных бактерий, обнаружен и у мельчайших бесстеночных прокариот. Это определяет необходимость коррекции представлений о взаимодействии микоплазм с клетками высших организмов, а также стратегии контроля инфектогенов.

КОНТРОЛЬ МИКОПЛАЗМЕННЫХ КОНТАМИНАЦИЙ

Отсутствие у микоплазм ригидной клеточной стенки обеспечивает возможность тесного контакта цитоплазматических мембран клеток паразита и хозяина, что в определенных условиях может приводить к слиянию клеток [1, 38]. Некоторые микоплазмы имеют такие специфичные полярные структуры, как «tip» или «bleb», опосредующие скользящее движение и адгезию бактерий к мембране эукариотической клетки [1, 39]. Адгезия может сопровождаться инвазией – проникновением в клетку [3]. Однако, даже оставаясь на поверхности, микоплазмы пребывают в тесной связи с мембраной хозяйской клетки и индуцируют модуляцию экспрессии генома и существенные изменения метаболизма эукариотической клетки [3, 38]. В серии специальных работ, посвященных выяснению особенностей модуляции транскрипционного профиля у клеточных культур при контаминации микоплазмами, показано, что заражение микоплазмами вызывает изменение экспрессии широкого ряда генов в хозяйской клетке (табл. 1). В число генов с выраженным изменением экспрессии входят важнейшие гены, кодирующие регуляторные белки – онкогены, гены-супрессоры опухолевого роста [40], цитокины [41], рецепторы и компоненты сигнальных путей [42]. Изменения экспрессии могут быть значительными уже через несколько часов по-

сле заражения [42], а длительное культивирование зараженных клеток (18 недель) может приводить к их необратимой трансформации, в том числе малигнизации [40]. Характер модуляции транскрипционного профиля у зараженных клеток в зависимости от вида микоплазм, типа клеточных культур, множественности инфекции, сроках культивирования

существенно различается. Таким образом, контаминация клетками микоплазмы исключает возможность адекватной оценки результатов, полученных с использованием таких культур. В частности, невозможно изучать влияние соединений, которые предполагается использовать в качестве перспективных фармакологических средств.

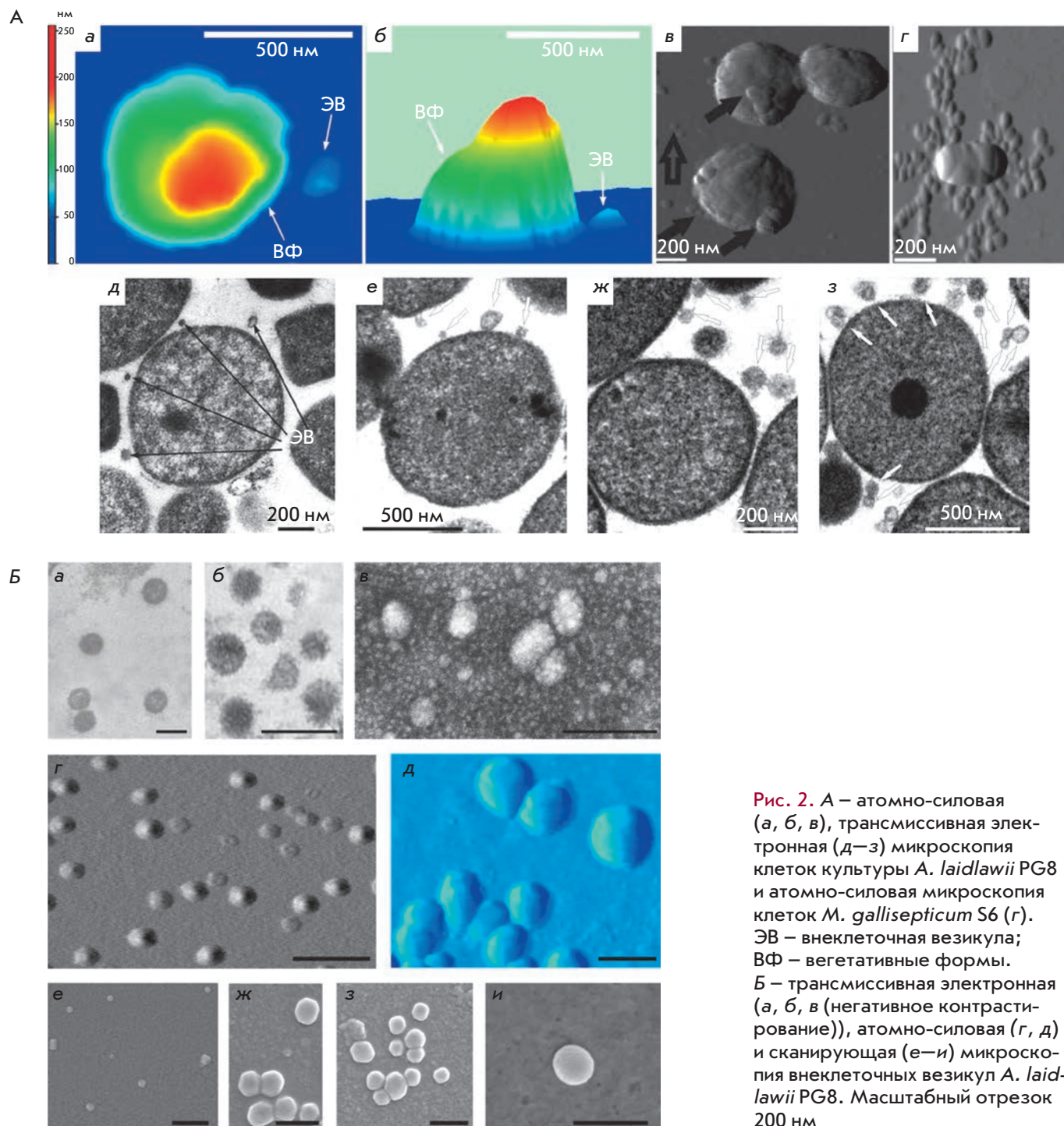


Рис. 2. А – атомно-силовая (а, б, в), трансмиссивная электронная (д–з) микроскопия клеток культуры *A. laidlawii* PG8 и атомно-силовая микроскопия клеток *M. gallisepticum* S6 (г). ЭВ – внеклеточная везикула; ВФ – вегетативные формы. Б – трансмиссивная электронная (а, б, в (негативное контрастирование)), атомно-силовая (г, д) и сканирующая (е–и) микроскопия внеклеточных везикул *A. laidlawii* PG8. Масштабный отрезок 200 нм

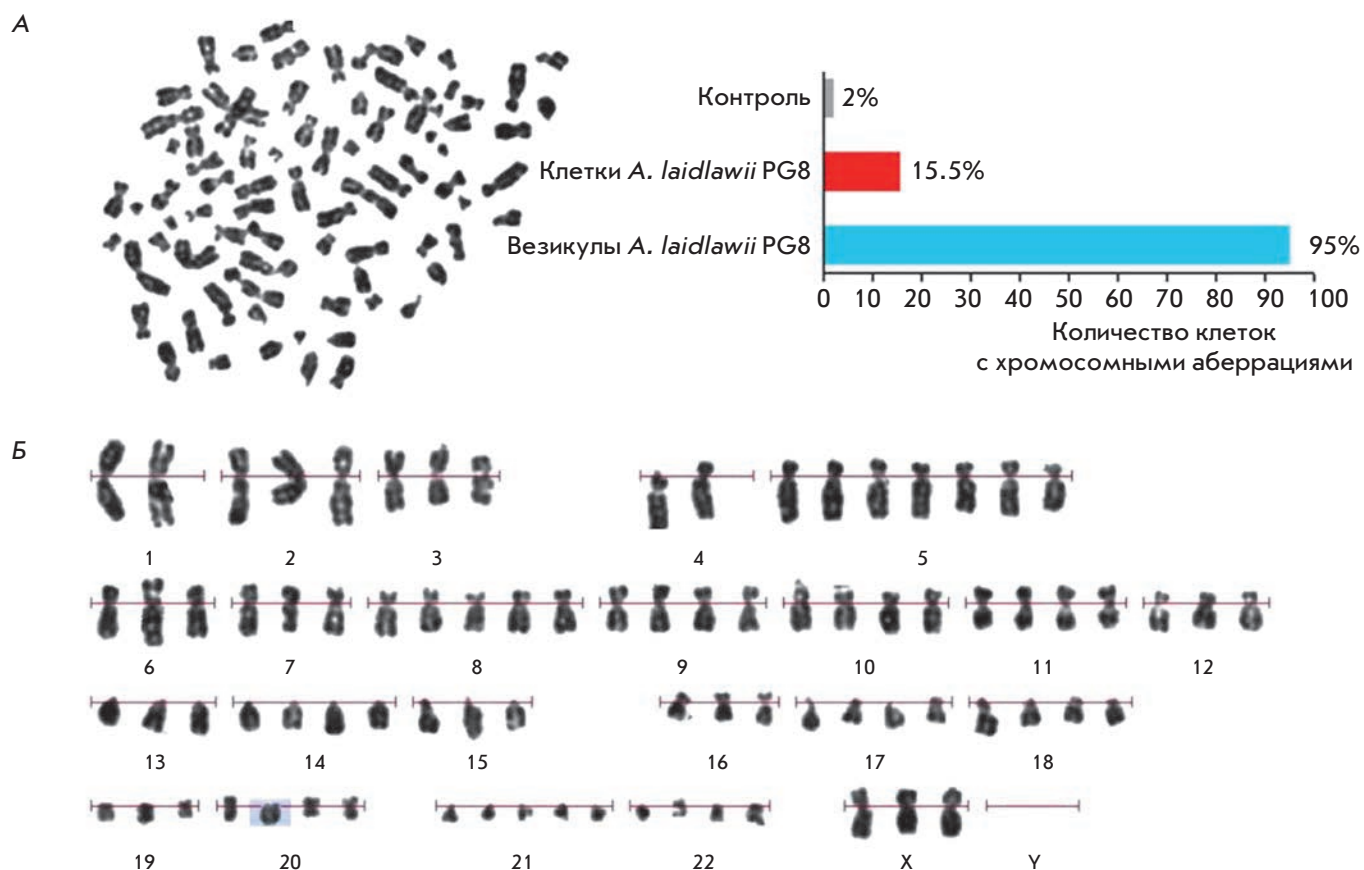


Рис. 3. Метафазная пластинка (А) и кариограмма (Б) лимфоцитов периферической крови человека после инкубации с везикулами *A. laidlawii* PG8

Таблица 1. Изменения экспрессии мРНК ряда генов в зараженных микоплазмами клетках через 3–7 сут после инфицирования

Микоплазма	Культура клеток	Индукция экспрессии мРНК	Подавление экспрессии мРНК	Ссылка
<i>M. fermentans</i>	Эпителиальные клетки предстательной железы HPV E7	14 цитокинов	TGFβ1, TGFβ3	[41]
<i>M. genitalium</i>		12 цитокинов	GM-CSF, IL-1Ra, M-CSF	
<i>M. hominis</i>		12 цитокинов	TGFβ2	
<i>M. penetrans</i>		14 цитокинов	TGFβ2	
<i>M. fermentans</i>	Эпителиальные клетки цервикального канала HPV E6	17 цитокинов	0	[41]
<i>M. genitalium</i>		13 цитокинов	G-CSF, IL-1Ra	
<i>M. hominis</i>		13 цитокинов	IL-1α, IL-1β	
<i>M. penetrans</i>		15 цитокинов	TGFβ2, TGF-β3	
<i>M. synoviae</i>	Макрофаги цыплят MDM	Цитокины, лизоцим, ингибитор апоптоза, 11 ферментов, 4 типа рецепторов, 10 белков сигнальных систем	Овотрансферрин, глутатион-S-трансфераза, гуанилат-связывающие белки	[42]
<i>M. fermentans incognitas</i>	Эмбриональные клетки мышцы СЗН	92 гена, кодирующих онкогены и супрессоры онкогенеза	43 гена, кодирующих онкогены и супрессоры онкогенеза	[40]
<i>Phytoplasma</i>	Культура растительных клеток павловнии	769 генов	437 генов	[45]

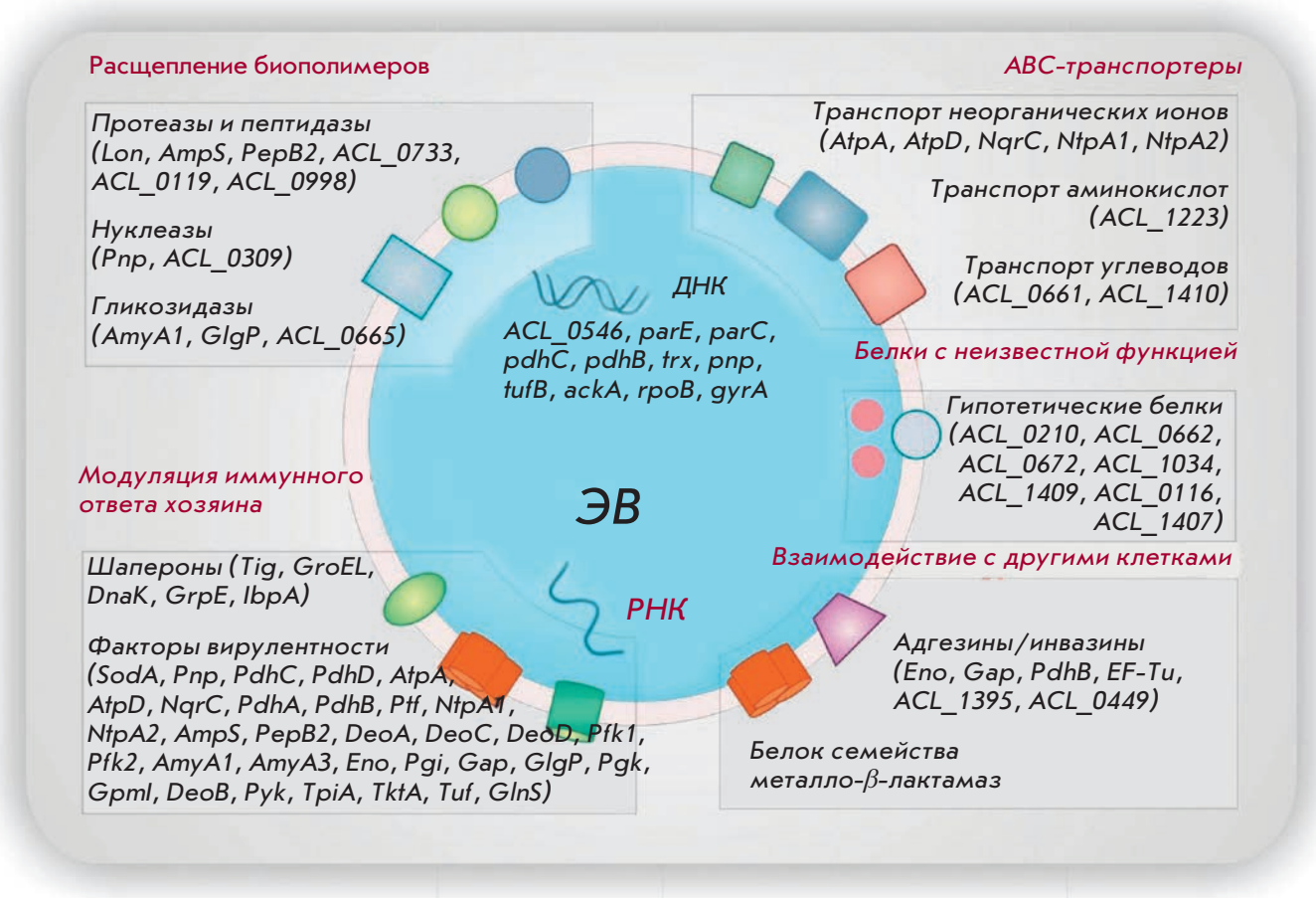


Рис. 4. Внеклеточные везикулы *A. laidlawii* PG8 содержат специфичный набор ДНК и РНК

Несмотря на идентификацию сотен генов, экспрессия которых изменяется при заражении эукариотических клеток микоплазмами [41–45], универсальные маркеры для контроля микоплазменных контаминаций выявить не удалось. Микоплазмы могут индуцировать активацию макрофагов, культивируемых *in vitro*, подавление презентации антигенов, модификацию иммунореактивности, сигнальной трансдукции, вирусной пролиферации и апоптоз [40, 46–54]. Микоплазменная контаминация может длительное время оставаться незамеченной, видимыми изменения становятся лишь при высокой множественности инфекции [1, 3]. Самым выраженным эффектом контаминации является полная потеря клеточной культуры из-за роста микроорганизмов и соответственно необратимого ухудшения состояния клеток. В зависимости от вида микоплазмы, типа клеточной линии и условий культивирования могут регистрироваться разнообразные цитопатические реакции, например конденсация хроматина, появление леопардовых клеток, возникновение хромосомных aberrаций, по-

давление клеточного деления, угнетение роста культуры [3, 5]. Основной причиной этого является вмешательство микоплазмы в клеточный метаболизм, конкурентное поглощение питательных компонентов и высвобождение бактериальных токсинов, ферментов деградации белков, ДНК, РНК [1, 38]. Активное участие в этих процессах могут принимать и внеклеточные везикулы микоплазм. В серии специальных экспериментов нами было показано, что на РНКазную активность везикул *A. laidlawii* PG8 и *M. hominis* RQ37 приходится 86 и 89% от общей активности всех клеточных и внеклеточных РНКаз этих бактерий [55]. Рибонуклеолитическая активность секретируемых везикул может в значительной мере обуславливать выявленные нами ранее генотоксические свойства этих контаминантов клеточных культур [56–58]. Учитывая цитотоксический потенциал многих бактериальных РНКаз [59–61], можно предположить, что цитопатические реакции загрязненных микоплазмами клеточных культур могут в значительной мере определяться активностью их везикулярных

Таблица 2. Методы, используемые для детекции микоплазм в клеточных культурах

Микробиологическое культивирование
Электронная микроскопия
Биохимические тесты
Детекция аденозинфосфорилазной активности (6-MPDR)
Ферментативное превращение АТФ → АДФ, выявляемое люциферазой
Хроматографическая детекция превращения радиоактивно меченного уридина в урацил с помощью уридинфосфорилазы микоплазмы
Иммунологические тесты
Иммунофлуоресценция
ELISA
Молекулярно-биологические тесты
Гибридизационный анализ
Дот-блот-гибридизация со специфичными зондами
ПЦР, ОТ-ПЦР
Микроскопическая детекция
Прямое окрашивание ДНК флуоресцентными красителями (DAPI, Hoechst 33258)
FISH-гибридизация <i>in situ</i> с использованием зондов, меченных флуоресцентными красителями

■ – официально одобрены рядом международных экспертных организаций:

FDA Points to Consider (May 1993), Regularien 21CFR610.30;

USDA federal code #9CFR113.28;

United States Pharmacopoeia, (USP 33/NF 28 <63> and <1226>, Mycoplasma tests, 2010); European Pharmacopoeia (EP 2.6.7., Mycoplasmas, 7th ed.; 2012);

Japanese Pharmacopoeia (JP);

ICH Guideline for biotechnological/biological products.

РНКа. Обнаруженная нами высокая везикулярная РНКа-активность микоплазм обуславливает возможность апоптогенного действия этих ферментов в отношении клеток-мишеней везикулярного трафика микоплазм.

Поскольку микоплазмы могут влиять практически на любой параметр эукариотической клетки, результаты, полученные при исследовании зараженных микоплазмами клеток, должны вызывать серьезные сомнения. В связи с этим редакции журналов рекомендуют авторам предоставлять данные о проверке экспериментального материала, и особенно клеточных культур, на контаминацию микоплазмами. Поскольку многие вирусные вакцины создаются на основе первичных клеточных культур, проблема заражения их микоплазмами имеет особое значение – контаминация вакцин представляет потенциальную опасность для здоровья человека [1, 3, 5]. В этой связи во многих странах требования к продукции, производимой на основе первичных клеточных культур, в том числе к вирусным вакцинам против кори, краснухи, полиомиелита, бешенства, свинки и некоторых других, включают тщательную проверку на контаминацию микоплазмами [3].

Таким образом, микоплазменная контаминация клеточных культур представляет серьезную про-

блему как для фундаментальных исследований, так и практических разработок. Очевидно, что все приобретенные клеточные культуры должны подвергаться тщательной проверке на инфицированность микоплазмами до введения в лабораторию, а уже используемые культуры должны проходить систематический контроль на микоплазменную контаминацию. Обнаружение у микоплазм везикулярного трафика, ассоциированного с внеклеточными везикулами, диктует необходимость распространения контроля и на инфектогены нового типа.

СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ МИКОПЛАЗМ

Универсальные индикаторы инфицированности клеток микоплазмами отсутствуют. Среди специальных средств диагностики (табл. 2) есть три способа, которые рекомендованы международными экспертными организациями.

Основной способ детекции микоплазм – микробиологическое культивирование [3, 62]. Для проведения анализа аликвота супернатанта клеточной культуры добавляется к жидкой среде для культивирования микоплазм, после инкубации в течение нескольких дней культура переносится на чашки с агаром, включающим те же компоненты среды. Чашки инкубируются в течение некоторого времени (до 2 недель) в аз-

робных условиях при температуре 37°C. Появление специфических двухфазных колоний типа «fried-eggs» («яичница-глазунья») указывает на присутствие микоплазм в тестируемых образцах. Теоретически этот тест очень чувствителен, но его проведение требует длительного времени (до 4 недель) и дорогих сред. Кроме того, многие виды микоплазм плохо растут на бесклеточных средах, а некоторые вообще не удается вырастить *in vitro* [1, 62]. При проведении этого теста возможно также заражение среды микоплазмами извне от исследователя, компонентов среды и лабораторного оборудования. Таким образом, этот способ детекции микоплазм включает риск получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Кроме того, метод культивирования не позволяет выявлять внеклеточные везикулы бактерий.

Второй рекомендованный подход к проверке контаминации клеточных культур микоплазмами – метод окрашивания ДНК флуорохромными красителями DAPI или Hoechst 33258 [3, 62, 63]. Этот тест весьма прост, и его проведение не требует длительного времени – результат может быть получен в течение 2–3 ч. Однако некоторые особенности состояния клеточной культуры могут быть причиной ошибочных заключений относительно контаминированности микоплазмами. Так, наличие в свободной от микоплазм культуре секретлируемых эукариотическими клетками внеклеточных везикул, содержащих ДНК и РНК, существенно затрудняет интерпретацию результатов, а обработка культуры антибиотиками исключает возможность использования соответствующего теста. Тем не менее этот способ весьма популярен в связи с его простотой, а также возможностью детекции в клеточных культурах некультивируемых или плохо растущих на бесклеточных средах микоплазм. В таком варианте теста супернатант тестируемой культуры добавляется к индикаторной, свободной от микоплазм клеточной культуре (линии Vero B4, NIH 3T3 или 3T6) [64]. Клетки выращивают во флаконах, содержащих стерильные слипы, которые после роста культуры в течение нескольких дней промывают и окрашивают флуорохромами. Однако в этом случае увеличивается длительность теста и возрастает риск распространения контаминантов в лаборатории.

Наиболее эффективным способом детекции микоплазменных контаминаций сегодня считается полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1, 3, 62, 65, 66]. Варианты ПЦР позволяют выявлять ДНК или РНК микоплазм. В качестве праймеров обычно используют олигонуклеотиды для амплификации переменных районов 16S рДНК или рРНК, а также последовательности 16–23S межгенных участков. При этом

ПЦР может быть представлена одним циклом амплификации или гнездовым вариантом с двумя парами праймеров. Последний способ увеличивает чувствительность и специфичность теста, но повышает риск получения ложных результатов из-за возможной контаминации целевой ДНК. Кроме того, компоненты среды могут быть ингибиторами Taq-полимеразы, поэтому ПЦР должна выполняться на экстрагированной ДНК, а не на грубом лизате супернатанта клеточной культуры. Использование антибиотиков в клеточной культуре может привести к ложным результатам, поэтому до проведения теста культура должна расти без антибиотиков на протяжении минимум 2 недель.

Проведение ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления рРНК, количество которой в клетках существенно превышает количество рДНК, повышает чувствительность теста, однако такой вариант, безусловно, трудоемок. Учитывая, что титр микоплазм в клеточных культурах достаточен для обнаружения бактериальной ДНК, простой одношаговый способ ПЦР вполне приемлем с точки зрения необходимости и достаточности. Он отвечает концепции экспресс-теста, который легко выполним, высокочувствителен, специфичен и экономичен. Вместе с тем положительные результаты ПЦР-теста еще не означают, что в образце присутствуют жизнеспособные клетки контаминанта (что важно учитывать при анализе материала после проведения процедур, направленных на эрадикацию микоплазм). В ряде случаев при положительном ПЦР-тесте культуры, анализируемой на контаминацию микоплазмами, для окончательного заключения все-таки требуется секвенирование ампликона. Тем не менее ПЦР-тест одобрен международными экспертными организациями, и на коммерческом рынке представлено достаточное количество наборов для тестирования клеточных культур на микоплазмы [3, 62]. Используемые в коммерческих наборах праймеры неэффективны для детекции внеклеточных везикул, но обнаружение специфических наборов нуклеотидных последовательностей ДНК в везикулах микоплазм [20, 21, 24, 36] открывает перспективы разработки ПЦР-диагностикомов и для обнаружения соответствующих инфектогенов.

Помимо указанных, официально одобренных способов детекции микоплазм, есть и другие методы – иммунологические и гибридизационные тесты с применением антисывороток, моноклональных антител или ДНК-РНК-гибридизации, предполагающие использование зондов с радиоактивной или флуорохромной меткой, а также биохимические, микроскопические и некоторые другие тесты (табл. 2) [1, 3, 43, 62, 67, 68]. Эти методы различаются по чувстви-

ности и также не свободны от недостатков, присущих описанным способам выявления микоплазменных контаминаций.

Представленные выше данные свидетельствуют, что проблема детекции микоплазменных контаминаций пока не решена. Ни один из имеющихся способов диагностики микоплазм не лишен недостатков и ограничений, поэтому проверку клеточных культур на контаминацию рекомендуется проводить одновременно несколькими способами [1, 3, 62]. Очевидно, что для тестирования компонентов сред на наличие таких инфектогенов, как внеклеточные везикулы бактерий, необходима разработка специальных тестов, основанных на маркерах этих органелл. Выявление универсальных маркерных последовательностей для детекции соответствующих инфектогенов предполагает комплексное исследование внеклеточных везикул у разных представителей класса Mollicutes. Пока в этом направлении сделаны только первые шаги [16, 20, 36, 37].

СПОСОБЫ ЭРАДИКАЦИИ МИКОПЛАЗМ

Лучшим способом решения проблемы микоплазменной контаминации клеточной культуры считается ликвидация зараженной культуры, замена ее на чистую, свободную от микоплазм [1, 3, 69]. Если это невозможно выполнить, то возникает проблема деконтаминации, решение которой предполагает эрадикацию микоплазм без повреждения эукариотических клеток. Однако несмотря на то, что на протяжении нескольких десятилетий разрабатывались и предлагались разнообразные способы элиминации микоплазм, эффективный способ деконтаминации пока не найден. Тем не менее энтузиазм исследователей не иссякает, и периодически появляются сообщения об успешной деконтаминации клеточных культур новым или описанным ранее, но модифицированным способом [1, 3, 69–71]. Наиболее распространенным подходом при этом является применение антибиотиков.

Особенности биологии микоплазм определяют характер чувствительности этих бактерий к антибактериальным препаратам: многие антибиотики неэффективны, поскольку у микоплазм отсутствуют мишени, на которые они действуют, например, пептидогликан клеточной стенки, синтез которого блокирует пенициллин [1, 3, 72]. С другой стороны, некоторые антибиотики не вызывают гибель микоплазмы, но замедляют ее рост и таким образом маскируют присутствие контаминанта [2]. Это обстоятельство является важной причиной рекомендаций не использовать антибиотики в профилактических целях при работе с клетками, культивируемыми *in vitro* [2, 5, 69]. Тем не менее поиск средств деконта-

минации клеточных культур продолжают связывать с антибиотиками [2, 3, 67, 69].

К настоящему времени известно три группы антибиотиков, проявляющих определенную активность в отношении микоплазм, – макролиды, хинолоны и тетрациклины [3, 69, 72]. В ряде публикаций сообщается, что серия обработок специальными комбинациями антибактериальных препаратов этих групп приводит к освобождению клеточных культур от микоплазм [3, 67, 69]. Однако экспериментальные попытки деконтаминации культур на основании опубликованных протоколов часто оказываются безуспешными [1, 71, 73]. Учитывая это, а также негативные результаты воздействия антибиотиков на клеточные культуры, большинство исследователей скептически относятся к попыткам решения проблемы эрадикации микоплазм с помощью антибактериальных агентов, но коммерческие компании продолжают активно рекламировать соответствующие препараты.

Существенная проблема антибиотикотерапии при микоплазменных инфекциях – быстрое приобретение микоплазмами резистентности к антибактериальным препаратам [1, 19, 74]. Механизмы оперативного формирования устойчивости микоплазм к антибактериальным препаратам не вполне ясны. Предполагается, что кроме известных механизмов развития резистентности к таким антибиотикам, как хинолоны, микоплазмы используют и другие, еще не установленные способы формирования устойчивости к антимикробным препаратам [75–77]. Недавно появились сообщения о возможности участия внеклеточных везикул в механизмах формирования резистентности к антибиотикам бактерий [78, 79], в том числе микоплазм [36]. Доказательства участия внеклеточных везикул в формировании резистентности микоплазм к антибиотикам показаны на примере *A. laidlawii*. Для этого были использованы различающиеся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммы микоплазмы – лабораторный (PG8) и полученный от него методом пошаговой селекции PG8R, проявляющий повышенную устойчивость к антибиотикам. Оказалось, что эти штаммы микоплазмы различаются также по выведению антибиотика и уровню образования везикул. Обнаружено, что повышенная устойчивость к антибиотикам у штамма PG8R ассоциирована с высоким уровнем образования везикул, и везикулы участвуют в трафике ципрофлоксацина и проявляют бактериостатический эффект в отношении чувствительного к антибиотикам штамма *Staphylococcus aureus*. У штамма с повышенной устойчивостью к ципрофлоксацину в гене-мишени этого антибиотика (топоизомеразы IV) в локусе *parC*, детерминирующем резистентность к фторхинолонам,

выявлена транзигция C → T (в положении 272, определяющая замену серина на лейцин (Ser (91) Leu) в молекуле целевого белка). Оказалось, что везикулы этого штамма микоплазмы экспортируют мутантный ген целевого белка. Опосредованный внеклеточными везикулами экспорт генов-мишеней антибиотика определяет возможность оперативного распространения в микробиоценозах мутантной мишени хинолонов путем горизонтального переноса [80]. Реализация такой возможности была недавно показана в модельных системах *Escherichia coli* и *Pseudomonas aerogenosa* [81, 82]. Изучение аналогичных процессов у микоплазм еще не завершено, однако уже понятно, что внеклеточные везикулы являются важным компонентом механизмов быстрой адаптации этих микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Принимая во внимание, что секреция везикул – это процесс, определяющий выживание микроорганизма в различных условиях [27, 32], поиск эффективных средств деконтаминации клеточных культур среди антибиотиков не представляется перспективным.

Таким образом, микоплазменные контаминации клеточных культур, диагностика и подавление микоплазм остаются серьезной проблемой [1, 3, 7, 69, 83, 84]. Очевидно, что необходима разработка надежных методов детекции инфектогенов и деконтаминации культур, основанных прежде всего на детальном изучении генетики и физиологии микоплазм.

Обнаружение у микоплазм везикулярного трафика, ассоциированного с внеклеточными везикулами, опосредующими межклеточные взаимодействия и патогенез, определяет необходимость учета инфектогенов нового типа. Поскольку клеточные культуры используются для получения вакцин и физиологически активных соединений, оперативное решение рассмотренной проблемы актуально как для фундаментальной науки, так и биотехнологического производства чистых препаратов нового поколения. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики РАН, принимавшим участие в проведении экспериментальной работы: А.А. Музыкантову, Н.Б. Барановой, Е.С. Медведевой, Г.Ф. Шаймардановой и М.В. Трушину.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета Министерства образования и науки РФ, а также поддержана РФФИ (гранты № 14-04-00883а, 12-04-01052а, 12-04-01226а), грантом Президента РФ (МК-3823.2023.4), грантом по государственной поддержке ведущих научных школ РФ (№ НИШ-825.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. СПб.: Наука, 2002. 320 с.
2. Uphoff C., Drexler H. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 731. P. 105–114.
3. Rottem S., Kosower N.S., Kornspan J.D. // *Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas, Biomedical Tissue Culture / Ed. Dr. Luca Ceccherini-Nelli.* 2012.
4. Robinson L.B., Wichelhausen R.H., Roizman B. // *Science.* 1956. V. 124. P. 1147–1148.
5. Drexler H.G., Uphoff C.C. // *Cytotechnology.* 2002. V. 39. № 2. P. 75–90.
6. Razin Sh. // *Prokaryotes.* 2006. V. 4. P. 836–904.
7. Folmsbee M., Howard G., McAlister M. // *Biologicals.* 2010. V. 38. P. 214–217.
8. Nikfarjam L., Farzaneh P. // *Cell J.* 2012. V. 13. № 4. P. 203–212.
9. Kühner S., van Noort V., Betts M.J., Leo-Macias A., Batisse C., Rode M., Yamada T., Maier T., Bader S., Beltran-Alvarez P., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1235–1240.
10. Yus E., Maier T., Michalodimitrakis K., van Noort V., Yamada T., Chen W.-H., Wodke J.A.H., Güell M., Martínez S., Bourgeois R., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1263–1268.
11. Maier T., Schmidt A., Gueell M., Kuehner S., Gavin A.C., Aebersold R., Serrano L. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 511. doi: 10.1038/msb.2011.38.
12. Oshima K., Ishii Y., Kakizawa S., Sugawara K., Neriya Y., Himeno M., Minato N., Miura C., Shiraishi T., Yamaji Y., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. e23242.
13. van Noort V., Seebacher J., Bader S., Mohammed S., Vonkova I., Betts M.J., Kuhner S., Kumar R., Maier T., O'Flaherty M., et al. // *Mol. Syst. Biol.* 2012. V. 8. P. 571.
14. Lluch-Senar M., Luong K., Lloréns-Rico V., Delgado J., Fang G., Spittle K., Clark T.A., Schadt E., Turner S.W., Korfach J., et al. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 1. e1003191.
15. Hopfe M., Deenen R., Grandi D., Köhrer K., Henrich B. // *PLoS One.* 2013. V. 8 (Suppl 1). e54219.
16. Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. // *J. Proteomics.* 2011. V. 74. № 12. P. 2920–2936.
17. Parraga-Nino N., Colome-Calls N., Canals F., Querol E., Ferrer-Navarro M. // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. № 6. P. 3305–3316.
18. Liu W., Fang L., Li M., Li S., Guo S., Luo R., Feng Z., Li B., Zhou Z., Shao G., Chen H., Xiao S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. e35698.
19. Razin S., Hayflick L. // *Biological.* 2010. V. 38. № 2. P. 183–190.
20. Чернов В.М., Чернова О.А., Горшков О.В., Баранова Н.Б., Музыкантов А.А., Нестерова Т.Н., Пономарева А.А. // *Докл. АН.* 2013. № 450. С. 483–487.
21. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Gorshkov O.V., Trushin M.V., Nesterova T.N., Ponomareva A.A. // *Scientific World J.* 2012. V. 2012. Article 315474. doi: 10.1100/2012/315474.
22. Lazarev V.N., Levitskii S.A., Basovskii Y.I., Chukin M.M., Akopian T.A., Vereshchagin V.V., Kostrjukova E.S., Kovaleva G.Y., Kazanov M.D., Malko D.B., et al. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 18. P. 4943–4953.

23. Чернов В.М., Чернова О.А., Медведева Е.С., Давыдова М.Н. // Докл. АН. 2011. № 438. С. 562–565.
24. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. // Scientific World J. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
25. Kulp A., Kuehn M.J. // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 163–184.
26. Lee E.Y., Choi D.S., Kim K.P., Gho Y.S. // Mass Spectrom. 2008. V. 27. № 6. P. 535–555.
27. Deatherage B.L., Cookson B.T. // Infect. Immun. 2012. V. 80. № 6. P. 1948–1957.
28. Gaudin M., Gauliard E., Schouten S., Houel-Renault L., Lenormand P., Marguet E., Forterre P. // Environmental Microbiol. Rept. 2013. V. 5. P. 109–116.
29. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., et al. // Proteomics. 2009. V. 9. № 24. P. 5425–5436.
30. Amano A., Takeuchi H., Furuta N. // Microbes Infect. 2010. № 12. P. 791–798.
31. Yoon H., Ansong C., Adkins J.N., Heffron F. // Infect. Immun. 2011. V. 79. № 6. P. 2182–2192.
32. Schertzer J.W., Whiteley M. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 23. № 1–2. P. 118–130.
33. Kluge S., Hoffmann M., Benndorf D., Rapp E., Reichl U. // Proteomics. 2012. V. 12. № 12. P. 1893–1901.
34. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C., Baldi P.C. // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e50214.
35. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. // J. Proteome Res. 2011. V. 10. № 3. P. 954–967.
36. Medvedeva E.S., Baranova N.B., Mouzykantov A.A., Grigorieva T.Y., Davydova M.N., Trushin M.V., Chernova O.A., Chernov V.M. // Scientific World J. 2014. V. 2014. Article 150615. doi: 10.1155/2014/150615.
37. Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Григорьева Т.Ю., Чернова О.А., Чернов В.М. // Докл. РАН. 2014. Т. 455. № 1. С. 99–104.
38. Rottem S. // Physiol. Rev. 2003. V. 83. № 2. P. 417–432.
39. Razin Sh., Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. N.Y.: Kluwer Acad. Plenum Publ., 2002. 572 p.
40. Zhang S., Tsai S., Lo S. // BMC Cancer. 2006. № 6. P. 116–126.
41. Zhang S., Wear D.J., Lo S. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000. V. 27. № 1. P. 43–50.
42. Lavrič M., Maughan M.N., Bliss T.W., Dohms J.E., Benčina D., Keeler Jr., Narat M. // Veterinary Microbiology. 2008. V. 126. № 1–3. P. 111–121.
43. Wang Z., Farmer K., Hill G.E., Edwards S.V. // Mol. Ecol. 2006. V. 15. № 5. P. 1263–1273.
44. Cecchini K.R., Gorton T.S., Geary S.J. // J. Bacteriol. 2007. № 189. P. 5803–5807.
45. Mou H.-Q., Lu J., Zhu S.-F., Lin C.-L., Tian G.-Z., Xu X., Zhao W.-J. // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. e77217.
46. Harper D.R., Kangro H.O., Argent S., Heath R.B. // J. Virol. Methods. 1988. V. 20. № 1. P. 65–72.
47. Cole B., Mu H.H., Pennock M.D., Hasebe A., Chan F.V., Washburn L.R., Peltier M.R. // Infect. Immun. 2005. V. 73. № 9. P. 6039–6047.
48. Gerlic M., Horowitz J., Farkash S., Horowitz S. // Cell Microbiol. 2007. V. 9. P. 142–153.
49. Quah B., O'Neill H. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 82. № 5. P. 1070–1082.
50. Zhang S., Lo S. // Curr. Microbiol. 2007. V. 54. № 5. P. 3888–3895.
51. Gong M., Meng L., Jiang B., Zhang J., Yang H., Wu J., Shou C. // Mol. Cancer Ther. 2008. V. 7. № 3. P. 530–537.
52. Kraft M., Adler K.B., Ingram J.L., Crews A.L., Atkinson T.P., Cairns C.B., Krause D.C., Chu H.W. // Eur. Respir. J. 2003. V. 31. № 1. P. 43–46.
53. Dusanic D., Bencina D., Oven I., Cizelj I., Bencina M., Narat M. // Veterenary Res. 2012. V. 43. P. 7–20.
54. Elkind E., Vaisid T., Kornspan J.D., Barnoy S., Rottem S., Kosower N.S. // Cell. Microbiol. 2012. V. 14. № 6. P. 840–851.
55. Ильинская О.Н., Сокуренок Ю.В., Ульянова В.В., Вершинина В.И., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Медведева Е.С., Баранова Н.Б., Давыдова М.Н., Музыкантов А.А. и др. // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 320–327.
56. Chernov V.M., Chernova O.A., Margulis A.B., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2009. V. 6. № 1. P. 104–107.
57. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. // Mutagenesis. 1995. V. 10. № 3. P. 165–170.
58. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V. // Mut. Res. 1996. V. 354. № 2. P. 203–209.
59. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS Lett. 2003. V. 540. P. 15–20.
60. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // BioEssays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
61. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
62. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 946. P. 1–13.
63. Chen T.R. // Exp. Cell Res. 1977. V. 104. № 2. P. 255–262.
64. Spierenburg G.T., Polak-Vogelzang A.A., Bast B.J. // J. Immunol. Meth. 1988. V. 114. № 1–2. P. 115–119.
65. Harasawa R., Mizusawa H., Fujii M., Yamamoto J., Mukai H., Uemori T., Asada K., Kato I. // Microbiol. Immunol. 2005. V. 49. № 9. P. 859–863.
66. Sung H., Kang S.H., Bae Y.J., Hong J.T., Chung Y.B., Lee C.K., Song S. // J. Microbiol. 2006. V. 44. № 1. P. 42–49.
67. Mariotti E., D'Alessio F., Mirabelli P., Di Noto R., Fortunato G., Del Vecchio L. // Biologicals. 2012. V. 40. № 1. P. 88–91.
68. Degeling M.H., Maguire C.A., Bovenberg M.S., Tannous B.A. // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 9. P. 4227–4232.
69. Uphoff C.C., Drexler H.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 946. P. 15–26.
70. Nir-Paz R., Prévost M.C., Nicolas P., Blanchard A., Wróblewski H. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 5. P. 1218–1225.
71. McGarrity G.J., Kotani H., Butler H. // Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis / Eds Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L., Baseman J.B. Washington: ACM, 1992. 906 p.
72. Bébéar C., Pereyre S., Peuchant O. // Future Microbiol. 2011. № 4. P. 423–431.
73. Singh S., Puri S.K., Srivastava K. // Parasitol. Res. 2008. V. 104. № 1. P. 181–184.
74. Coldwell D.L., Tagg K.A., Jeffreys N.J., Gilbert G.L. // Int. J. STD AIDS. 2013. V. 24. № 10. P. 822–828.
75. Raherison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 1. P. 421–424.
76. Ruiz J., Pons M.J., Gomes C. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2012. V. 40. № 3. P. 196–203.
77. Yamaguchi Y., Takei M., Kishii R., Yasuda M., Deguchi T. // Agents Chemother. 2013. V. 57. № 4. P. 1772–1776.
78. Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Hoiby N. // J. Antimicrob. Chemother. 2000. V. 45. № 1. P. 9–13.
79. Lee J., Lee E.Y., Kim S.H., Kim D.K., Park K.S., Kim K.P., Kim Y.K., Roh T.Y., Gho Y.S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 6. P. 2589–2595.

80. Stanhope M.J., Walsh S.L., Becker J.A., Italia M.J., Ingraham K.A., Gwynn M.N., Mathie T., Poupard J.A., Miller L.A., Brown J.R., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4315–4326.
81. Manning A.J., Kuehn M.J. // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. P. 258. doi: 10.1186/1471-2180-11-258.
82. Maredia R., Devineni N., Lentz P., Dallo S.F., Yu J., Guentzel N., Chambers J., Arulanandam B., Haskins W.E., Weitao T. // *Scientific World J.* 2012. V. 2012. Article 402919. doi: 10.1100/2012/402919.
83. David S.A., Volokhov D.V., Ye Z., Chizhikov V. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 9. P. 2718–2728.
84. Windsor H.M., Windsor G.D., Noordergraaf J.H. // *Biologicals.* 2010. V. 38. № 2. P. 204–210.

УДК 577.151.4; 577.325.2; 577.325.3

Структурные особенности взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК

В. В. Коваль^{1,2}, Д. Г. Кнорре^{1,2}, О. С. Федорова^{1,2*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.02.2014

РЕФЕРАТ Рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента репарации 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК; проанализирована организация активного центра этого фермента. Обобщены данные о роли отдельных аминокислотных остатков hOGG1 в процессах специфического узнавания окисленного основания ДНК, образования фермент-субстратного комплекса и удаления поврежденного основания из ДНК. Приведены структурные данные об изменении активного центра фермента и нарушении ферментативной активности hOGG1 в результате введения точечных аминокислотных замен. Обсуждается структурно-динамический механизм удаления окисленных оснований из ДНК с помощью hOGG1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белково-нуклеиновое узнавание, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека, ферменты репарации, функциональные мутанты, структурный анализ hOGG1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AP – апуриновый/апиримидиновый сайт; 8-охоG – 7,8-дигидро-8-оксогуанин.

ВВЕДЕНИЕ

Большое количество трехмерных структур белков и их комплексов, определенных и ставших доступными для анализа за последние полвека (по состоянию на апрель 2014 года база данных трехмерных структур биомолекул Protein Data Bank (PDB) содержит около 100 000 записей), вполне естественно привело к повышению внимания к взаимосвязи между структурой и функциями белков. В настоящем обзоре рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента hOGG1 с ДНК, содержащей повреждения.

Генетический материал всех живых организмов подвергается постоянному и активному воздействию как экзогенных, так и эндогенных факторов. Среди этих факторов можно выделить активные формы кислорода (АФК), высокореакционные клеточные метаболиты, различного типа ксенобиотики, воздействие ультрафиолетового и ионизирующего излучения и т.д. Среди широкого спектра воздействий, которым подвержены молекулы ДНК [1–4] и которые приводят к возникновению многих заболеваний [5–10], особенно широко представлены такие активные формы кислорода, как $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} [11, 12], образующиеся при аэробном метаболизме. Основными про-

дуктами модификации пуриновых оснований в ДНК являются 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин, 8-охоG) и 5-формаидопиримидиновые производные аденина – 4,6-диамино-5-формаидопиримидин (Фару А), и гуанина – 2,6-диамино-4-окси-5-формаидопиримидин (Фару G) [13, 14].

Появление в генетическом материале клетки окисленных оснований приводит к дестабилизации генома. Например, 8-оксогуанин способен образовывать с аденином комплементарную пару Хугстеновского типа. Вследствие этого в первом цикле репликации ДНК-полимераза может включать во вновь синтезируемую цепь напротив 8-охоG аденозин вместо цитозина (в результате образуется пара 8-охоG/А). Во втором цикле репликации полимераза встраивает Т против А; таким образом, после двух циклов репликации происходит замена G/C → T/A [15, 16].

Для того чтобы противостоять накоплению 8-охоG в ДНК, клетки живых организмов создали специальную защитную систему (GO-систему) [17, 18]. Эта система достаточно хорошо охарактеризована в бактериях *Escherichia coli*. Она состоит из трех ферментов: Fpg (MutM) – специфическая N-гликозилаза/AP-лиаза, удаляющая остатки 8-оксогуанина;

MutY – специфическая N-гликозилаза, удаляющая остаток аденина напротив 8-оксогуанина; и MutT – фосфатаза, гидролизующая пирофосфатную связь в 8-охо-dGTP. Клетки эукариотических организмов содержат структурные или функциональные гомологи этих бактериальных ферментов [19, 20]. Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК эукариот осуществляет 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1) [21]. Показано, что каждая клетка человека содержит около 50 тысяч молекул OGG1, которые защищают геномную ДНК от накопления продуктов окисления пуринов [22].

В клетках человека ген *OGG1* локализован в коротком плече хромосомы 3 (3p25/26). В процессе транскрипции с него синтезируются две основные формы мРНК, которые кодируют белки, состоящие из 345 и 424 аминокислот, α -hOGG1 и β -hOGG1 соответственно [21, 23–26]. У обеих форм hOGG1 первые 316 аминокислот совпадают; различаются С-концевые части белка [21, 23–27]. Анализ локализации в клетке этих форм фермента OGG1 показал, что α -hOGG1 находится в ядрах, а β -hOGG1 – в митохондриях [27]. Ядерный белок α -hOGG1 высококонсервативен, он охарактеризован в клетках человека, а также в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, растениях *Arabidopsis thaliana*, дрозофиле *Drosophila melanogaster* и у ряда млекопитающих [28]. Гомология между белком α -hOGG1 дрожжей и человека достигает 38%. Белок OGG1 β -типа обнаружен только в митохондриях клеток человека [28]. Каталитические механизмы и структурные свойства изучены только для белка α -hOGG1.

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ hOGG1

Фермент hOGG1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой/ β -лиазой, он способен расщеплять N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного 8-охоG, а затем катализировать разрыв 3'-фосфодиэфирной связи. Рассматриваемый химический механизм первоначально был предложен в группе Wallace S.S. для эндонуклеазы III из *E. coli* [29]. Основные идеи, предложенные в упомянутой работе, были позже экспериментально подтверждены группой Lloyd R.S. [30] на основании анализа ковалентных сшивок между ферментом и ДНК. В соответствии с предложенным механизмом при инкубации ДНК и фермента в условиях образования оснований Шиффа и последующего его восстановления боргидридом натрия возникает ковалентная сшивка ДНК с белком.

Каталитический механизм действия фермента hOGG1 включает участие аминокислотной боковой цепи заместителя остатка Lys249, который замещает основание 8-охоG у атома C1' остатка рибозы и способ-

ствует элиминированию 3'-фосфодиэфирной связи через промежуточное образование основания Шиффа с C1'-атомом дезоксирибозы (рис. 1) [31–33]. Ранее Verdine G.L. и соавт. показали, что мутантная форма K249Q hOGG1 не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать повреждение в ДНК [21]. Вторая химическая стадия – разрыв фосфодиэфирной связи со стороны 3'-атома углерода остатка 2'-дезоксирибозы – протекает по механизму β -элиминирования (AP-лиазная активность).

Опираясь на многочисленные структурные и биохимические работы, Verdine G.L. и соавт. [34] высказали предположение, что в кислотно/основном взаимодействии с атомами N ϵ (аминогруппа Lys249), C2', O4' участвует вырезаемое основание 8-охоG. Изучена структура восстановленного боргидридом натрия интермедиата, получаемого в ходе взаимодействия фермента hOGG1 с 8-охоG-содержащим ДНК-субстратом. Оказалось, что вырезаемое из ДНК основание 8-охоG не покидает фермент, а остается в активном центре и выступает в качестве кофактора стадии β -элиминирования. В структуре фермента атом N9 остатка 8-охоG располагается близко к атомам N ϵ и O4', что позволяет ему участвовать в передаче протона между этими атомами.

На рис. 1 представлен механизм реакции, катализируемой hOGG1, предложенный в [34]. На первой стадии в результате атаки ϵ -аминогруппой Lys249 по атому C1' дезоксирибозы происходит разрыв гликозидной связи и образование аниона основания 8-охоG⁻. Анион затем отрывает протон от ϵ -NH₂-группы Lys249, при этом образуется аминаль **3**. Протонированный 8-охоGH отдает протон на атом O4' остатка рибозы; в результате этого аминаль **3** реорганизуется в основание Шиффа **4** с раскрытием фуранозного цикла. Основание Шиффа **4** несет дополнительный протон на атоме N ϵ Lys249, который передается снова на 8-охоG⁻. Образуется 8-охоGH и незаряженное основание Шиффа **5**, в котором протекает реакция β -элиминирования, приводящая к разрыву 3'-фосфодиэфирной связи. При этом образуются фрагменты ДНК с 5'-фосфатом и положительно заряженный интермедиат **6**, содержащий на 3'-конце α,β -ненасыщенное основание Шиффа, несущее положительный заряд. В результате гидролиза интермедиата **6** образуется свободный фермент и фрагмент ДНК, содержащий на 3'-конце 4-гидрокси-2,3-пентеналь-1.

К настоящему моменту база данных трехмерных структур белков PDB содержит информацию о 27 структурах hOGG1. Разрешены структуры hOGG1 в форме свободного фермента [35] и различных комплексов с ДНК: каталитически неактивных мутантов K249Q hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК [35,

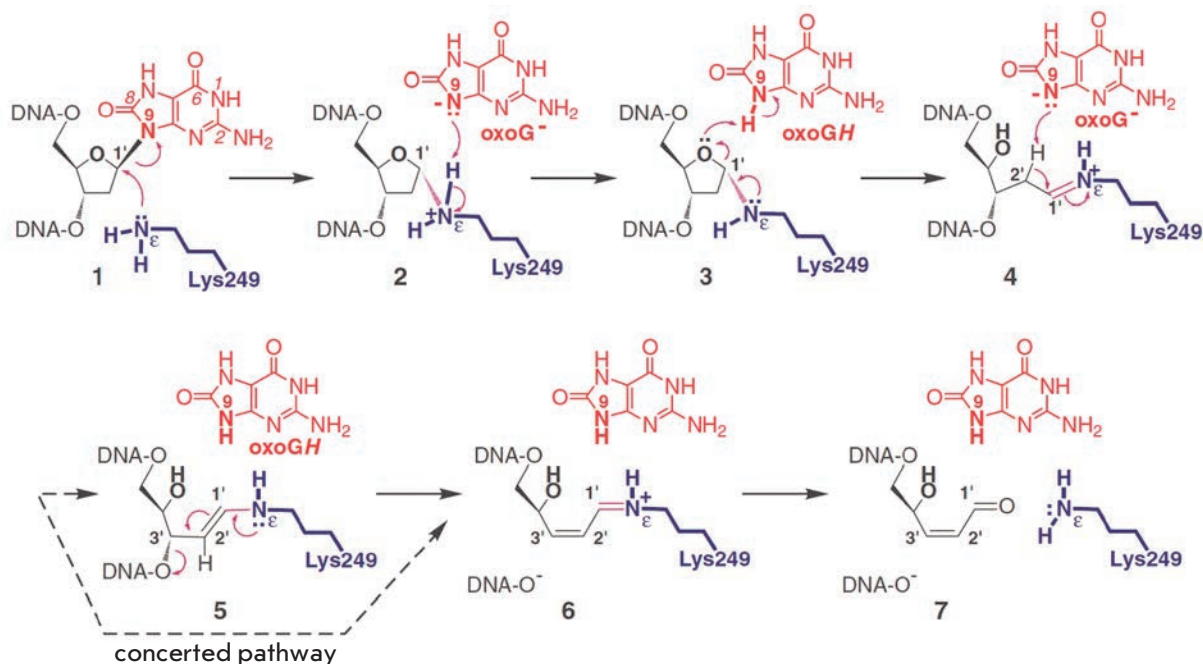


Рис. 1. Предполагаемый пошаговый механизм действия hOGG1, в котором вырезаемое на первой стадии основание 8-охоГ выступает в качестве кофактора стадии β -элиминирования. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nat. Struct. Biol.] Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. № 3. P. 204–211, copyright 2003)

36], N149C с oxoG-содержащей ДНК и неповрежденной ДНК [37], D268N с oxoG-ДНК и ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана (F-лиганд) – «стоп»-субстрата для hOGG1 [33, 38]; комплекс WT hOGG1 с F-лигандом [33]. Помимо вышеупомянутых, изучены структуры ковалентного аддукта hOGG1 с AP-субстратом [34], полученного в результате восстановления основания Шиффа боргидридом натрия, а также комплексов мутантов hOGG1 (H270A, Q315A, Q315F, G42A), содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 7,8-дигидро-8-оксогуанином [32]. Изучена также структура позднего интермедиата, в котором основание 8-охоГ почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрел конечную каталитически активную конформацию [32].

СТРУКТУРА КАТАЛИТИЧЕСКИ НЕАКТИВНОГО МУТАНТА K249Q hOGG1

Первая структура комплекса ДНК, содержащей остаток 8-охоГ, с узнающим ее белком была получена для мутанта hOGG1 с заменой K149Q. Кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены после удаления неструктурированных N- и C-концов и участка петли 80–82. Это позволило изучить структуру комплекса корового домена 12–325

мутанта с 15-звенным дуплексом, содержащим пару 8-охоГ/С (рис. 2). Ранее было показано [21], что мутантная форма, в которой остаток Lys249 заменен на остаток Glu, не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать субстрат. Поскольку в работе [36] не удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы комплекса полноразмерного hOGG1 K249Q с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим 8-охоГ/С, то с помощью ограниченного трипсинового гидролиза из белка были удалены неструктурированные аминокислотные концы, а также аминокислотные остатки участка петли 80–82. В результате был закристаллизован комплекс корового домена hOGG1, состоящий из аминокислотных остатков 12–325 с 15-звенным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим пару 8-охоГ/С, и изучена его структура (рис. 2).

Показано, что укладка белка hOGG1 типична для суперсемейства белков репарации ДНК, участвующих в механизме эксцизионной репарации оснований (base excision repair BER), таких, как эндонуклеаза III и алкил-ДНК-гликозилаза AlkA из *E. coli* [39]. Белки этого семейства обнаружены у многих организмов, от бактерий до млекопитающих, они репарируют различные повреждения гетероциклов, возникающих в результате окисления, алкилиро-

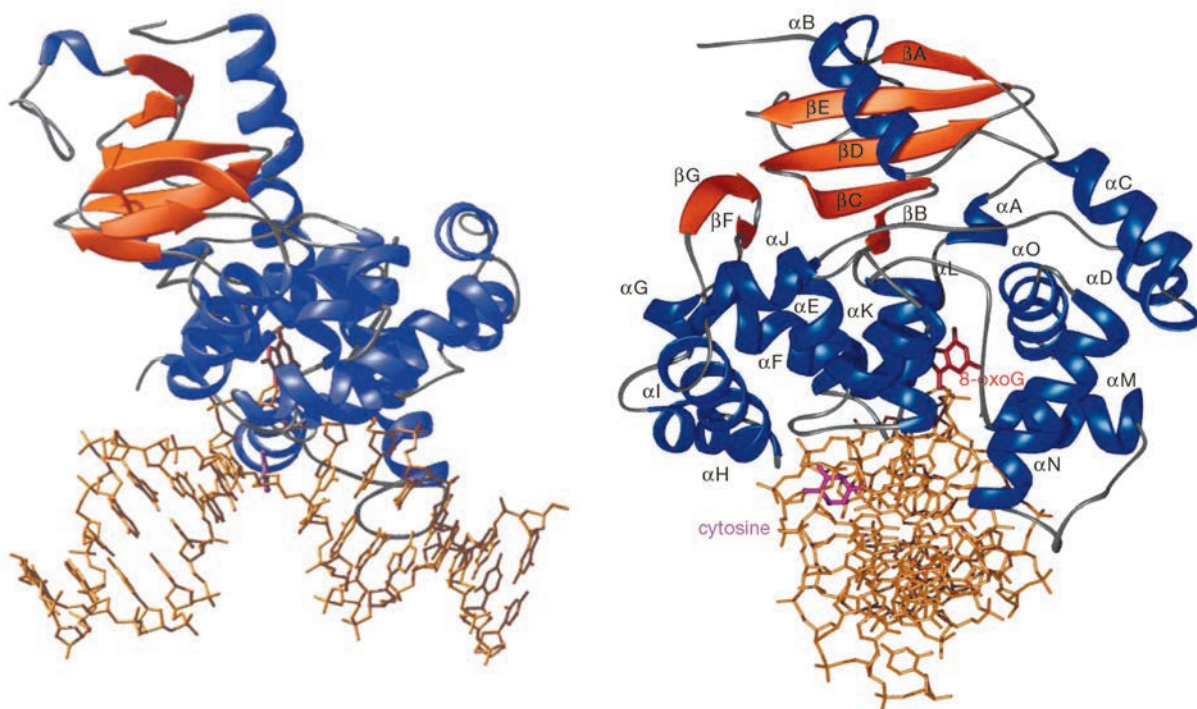


Рис. 2. Структура комплекса hOGG1-ДНК. Два ортогональных представления комплекса hOGG1-ДНК, на которых белок изображен в виде ленты (синим цветом изображены α -спирали, оранжевым – β -складки, серым – неструктурированные элементы); 15-звенный ДНК-дуплекс окрашен в желтый цвет. Основание 8-охоG (красное) полностью вывернуто из спирали ДНК и помещено в карман активного центра белка. Комплементарный ему цитозин (пурпурный) частично сохраняет стэкинг с основаниями своей цепи. Фермент изгибает ДНК на $\sim 70^\circ$ в плоскости пары оснований 8-охоG·C. Изгиб в ДНК приводит к экспонированию остатка цитозина в бороздку в направлении расположения боковых цепей аминокислот белка, что приводит к образованию специфических контактов. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Nature. 2000. V. 403. P. 859–866, copyright 2000)

вания и дезаминирования ДНК. Особенность этих белков – наличие характерного структурного элемента «спираль-шпилька-спираль» (helix-hairpin-helix, HhH) [40], за которым следует Gly/Pro-богатая петля и консервативные остатки Gly, Pro и Asp (HhH-GPD). Структура hOGG1 содержит также два α -спиральных домена, общих для всех членов этого суперсемейства HhH-GPD, и третью антипараллельную β -складчатую структуру, которая есть еще только в алкил-ДНК-гликозилазе AlkA.

Белок прочно связывается с 8-охоG-содержащей цепью ДНК (рис. 2). Остаток 8-охоG полностью выворачивается из спирали ДНК и помещается в карман активного центра фермента, что согласуется с особенностями аналогичных структур в других членах суперсемейства белков HhH-GPD [31, 40, 41]. Хотя в случае нуклеотида 8-охо-dG гетероцикл находится в *syn*-конфигурации относительно гликозидной связи, в активном центре hOGG1 он связывается в *anti*-конформации, т.е. так, как это должно быть в нормальном ДНК-дуплексе. Вывернутая конфор-

мация гликозильного остатка и остова ДНК приводит к тому, что остаток 8-охоG располагается далеко от спирали ДНК и погружается глубоко в область активного центра hOGG1.

Взаимодействие hOGG1 с фосфатными группами 8-охоG-содержащей цепи, самим остатком 8-охоG и комплементарным ему цитозином создает суммарную площадь контакта 2.268 \AA^2 [36]. В то время как у большинства ДНК-связывающих белков в области контакта находится много остатков лизина и аргинина, для взаимодействия с фосфатными группами hOGG1 связывает остов ДНК в почти нейтрально заряженный канал (рис. 3), в котором расположен один основной остаток His270. Уникальная особенность образующегося комплекса состоит в наличии в hOGG1 большого числа α -спиралей, у которых N-концы ориентированы в сторону ДНК (рис. 2). Такое расположение α -спиралей усиливает спираль-дипольное взаимодействие, делая более вероятным создание дипольных электростатических контактов, а не солевых мостиков при связывании

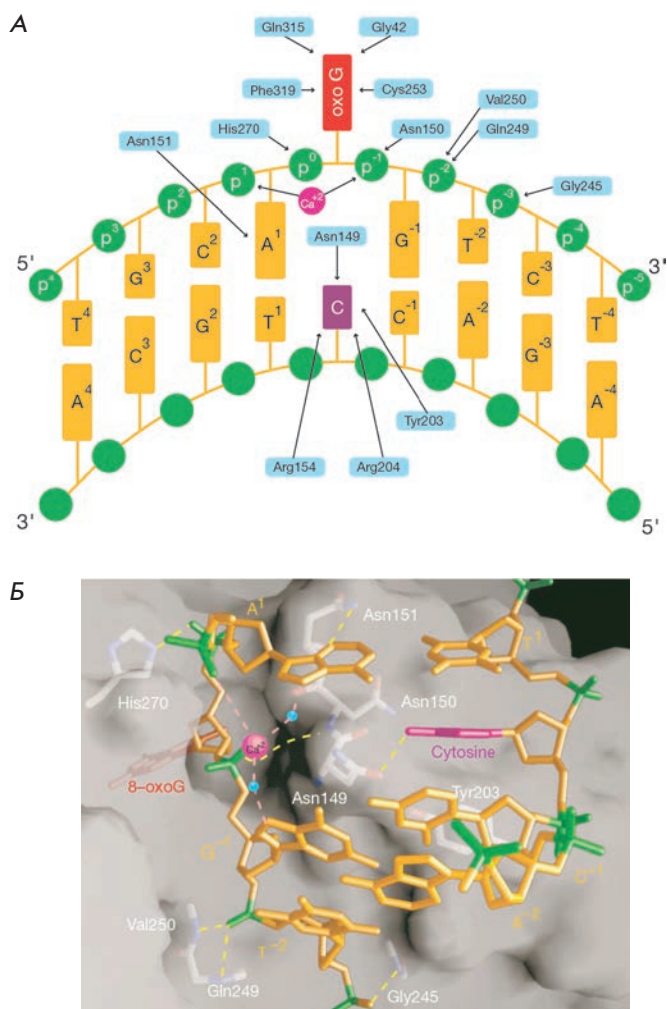


Рис. 3. Схема взаимодействия оснований ДНК с аминокислотными остатками hOGG1. А – дуплекс, содержащий пару 8-охоG/C и взаимодействующие с ним аминокислоты. Б – поверхность взаимодействия ДНК-дуплекса и фермента hOGG1. Водородные связи показаны желтым пунктиром, координационные связи иона кальция с молекулами воды – розовым. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Nature. 2000. V. 403. P. 859–866, copyright 2000)

ДНК-субстратов. Только одна из спиралей фермента, α L, действительно контактирует с остовом ДНК. Спираль α L с петлей и спиралью α K образуют консервативный элемент NhH. В дополнение к контакту с фосфатом, который создается спиралью α L и фосфатной группой p⁻² (Val250 и Gln249), высококонсервативный остаток глицина (Gly245), расположенный в петле, образует водородную связь с фосфатом p⁻³ (см. рис. 3). Структурный элемент NhH образует контакт с ДНК-субстратом с 3'-стороны от повреждения;

в этом месте структура ДНК-дуплекса почти не отличается от В-формы. Следовательно, элемент NhH, главным образом, вовлечен в позиционирование дуплекса для ориентации повреждения в сторону кармана активного центра.

Взаимодействие фосфатных групп p⁻¹, p⁰ и p¹ очень важно для стабилизации нестандартной конформации ДНК-остова в месте расположения повреждения. Вращения вокруг связей, которые необходимы для выворачивания остатка 8-охоG из спирали, вызывают поворот атомов кислорода при фосфате p⁻¹ внутрь по направлению к оси спирали, вносят дополнительное напряжение в рибозофосфатный остов ДНК. Чтобы ослабить электростатическое отталкивание, вызванное близким расположением фосфатов p⁻¹ и p¹, между ними размещается присутствующий в кристаллизационной среде частично гидратированный ион Ca²⁺, который координируется напрямую с p¹ и через мостиковую воду – с p⁻¹ (рис. 3Б). Хотя ион Ca²⁺, который может замещаться ионом Mg²⁺ в физиологических условиях, непосредственно не взаимодействует с белком, однако его лиганд, молекула воды, образует водородную связь с ДНК, стабилизируя тем самым ее вывернутую и изогнутую конформацию.

Комплементарный цитозин находится внутри спирали, однако он практически не образует стэкинга с соседними основаниями с 5'-стороны из-за изгиба в этом месте цепи ДНК, которое вызывает разворачивание дуплекса в сторону от молекулы фермента. За пределами активного центра конформация ДНК близка к канонической В-форме (рис. 2).

Область дуплекса, высвобождаемая после выворачивания остатка 8-охоG, заполняется аминокислотными остатками консервативного NNN-элемента (последовательность из трех расположенных подряд остатков аспарагина), а именно, остатком Asn149, который образует водородную связь между амидным карбонилем бокового заместителя и экзоциклической аминогруппой остатка цитозина комплементарной цепи (рис. 3Б). Кроме того, hOGG1 погружает арильное кольцо остатка Tyr203 в пространство между C⁰ (комплементарным цитозином) и основанием с 5'-стороны (рис. 3Б), тем самым ликвидируя стэкинг двух оснований и образуя острый излом в спирали ДНК, что существенно улучшает доступ со стороны малой бороздки к той части основания, которое участвует в уотсон-криковском взаимодействии. Основание C⁰ также теряет стэкинг с 3'-стороны с соседним основанием (см. на рис. 3Б основание T¹). Аминокислотные остатки Arg154 и Arg204 hOGG1 перемещаются в сторону C⁰ со стороны малой бороздки; один аргинин располагается сверху, а другой снизу плоскости пиримидинового кольца, и одновременно образуются

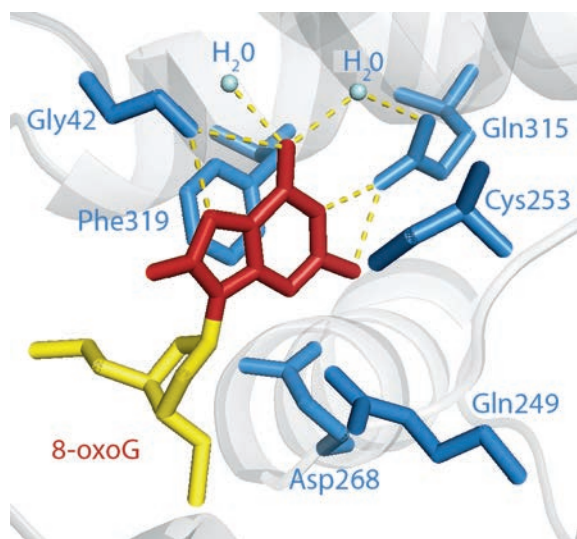


Рис. 4. Аминокислоты активного центра hOGG1, участвующие в узнавании основания 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1EBM [36] с помощью программного пакета PyMOL [43]

водородные связи с акцепторными атомами N3 и O2 цитозина C⁰. Эти взаимодействия, по-видимому, исключительно сильные, они требуют присутствия соседних акцепторных атомов, что является уникальным для цитозина в сравнении с другими гетероциклическими основаниями в ДНК. Следовательно, вместе с взаимодействием между Asn149 и амидным карбонилем цитозина C⁰ между ферментом и комплементарным остатком цитозина может образоваться до пяти водородных связей.

Роль остатка Asn149 подтверждена в работе [42], в которой показано, что остаток Asn149 образует водородную связь с атомом N4 экзоциклической аминогруппы остатка цитозина, комплементарного 8-охоG. В комплексе с водородными связями, образованными гуанидиниевой группой остатка Arg204 с атомами N1 и O2, это обеспечивает уникальный узнающий фрагмент для комплементарного цитозина и играет, по-видимому, главную роль в обеспечении специфичности по отношению к остатку цитозина в комплементарной цепи, которая характерна для hOGG1.

Узнавание 8-охоG в активном центре происходит путем формирования специфических контактов между поврежденным основанием и аминокислотными остатками белка. Фермент узнает уреидный фрагмент 8-охоG, включающий C8-карбонильную группу, атомы N7 и N9. При этом атом N7 образует водородную связь с карбонилем остатка Gly42. Среди

всех контактов 8-охоG имеется только одно взаимодействие с остатком Gly42, которого нет у гуанина. Поэтому в работе [36] делается вывод о том, что ответственность за дискриминацию 8-охоG от G несет только одна водородная связь. Необходимо отметить, что критически значимая аминокислота Gly42 помещается в β -складчатом домене, расположенном в области контакта hOGG1-ДНК.

Кроме упомянутых выше, в узнавании 8-охоG участвуют также другие аминокислоты активного центра hOGG1. Остатки Phe319 и Cys253 взаимодействуют с π -системой 8-охоG с двух противоположных сторон, образуя структуру сэндвича (рис. 4). Амидная NH₂-группа остатка Gln315 через прочно связанную в активном центре молекулу воды взаимодействует с атомом O6 основания 8-охоG, а боковая карбонильная группа остатка Gln315 образует две водородные связи с атомами N1 и N2 8-оксогуанина. Вторая прочно связанная молекула воды также образует водородную связь с атомом O6. Взаимодействие остатков Gln315 и Gly42, а также связанных в активном центре молекул воды, по своим характеристикам не позволяет образовывать донорно-акцепторные водородные связи с A, C и T.

Анализ структурных данных [36] позволяет глубже понять роль каталитически важных аминокислотных остатков Lys249 и Asp268. Остаток Lys249 находится на расстоянии ~2.5 Å от атома C1' 8-охоG вблизи от места в активном центре, в которое выворачивается окисленное основание; а остаток Asp268 ориентирован подходящим образом для того, чтобы проводить протонирование/депротонирование Lys249. Интермедиат, образовавшийся при атаке дезоксирибозы остатком Lys249, перегруппировывается в основание Шиффа (рис. 1). Эта перегруппировка требует депротонирования боковой аминогруппы остатка Lys249, возможно, с помощью Asp268, и протонирования атома O1', для чего подходящим образом ориентирован остаток His270. Такая роль остатка His270 хорошо объясняет его инвариантность среди членов суперсемейства HhH-GPD, поскольку он необходим для катализа стадии образования основания Шиффа.

КОМПЛЕКС КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОГО hOGG1 СО «СТОП»-СУБСТРАТОМ

Изучена структура комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей вместо 8-охоG остаток 2-оксиметил-3-окситетрагидрофурана (F) [33]. Такой фрагмент ДНК служит «стоп»-субстратом для hOGG1. Показано [33], что в полученной структуре (PDB ID: 1FN7) Asp268 расположен достаточно далеко от Lys249, чтобы активировать депротонирование его боковой аминогруппы; расстояние N–O равно 3.7 Å. Более того,

остаток Asp268 не имеет контакта с His270, который, по-видимому, нужен для образования водородной связи с атомом O1' рибозы, обнаруженной в структуре K249Q hOGG1 [36]. Таким образом, отсутствие окисленного основания ДНК, выворачиваемого из цепи и помещаемого в карман активного центра, привело к изменению структуры фермента.

Основываясь на полученных данных, в работе [33] был сделан вывод, что, во-первых, 8-охоG-узнающий карман hOGG1 хорошо подогнан под структуру поврежденного основания, позиционируя нужным образом остатки Phe319, His270 и Asp268. Во-вторых, в данной работе роль остатка Asp268, действующего как депротонирующее Lys249 основание, не подтверждена и не опровергнута. Высказана гипотеза, что этот остаток создает электростатическое поле, стабилизирующее положительный заряд, возникающий на стадии переходного состояния на атомах O1' и C1' дезоксирибозы 8-охоG.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ hOGG1 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ДНК

Кристаллическая структура свободного фермента hOGG1 и его комплекса с 8-охоG-содержащей ДНК, получены в работе Bjørås M. и соавт. [35] с разрешением 2.15 Å. В составе комплекса с ДНК так же, как и в работе [36], использовали каталитически неактивный мутант K249Q. Согласно данным [35], структура hOGG1 существенно различается у свободной формы и связанной в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК (рис. 5). В узнавании поврежденного основания принимают участие остатки Phe319, Cys253, Gly42, Gln43, Phe45 и Gln315, что согласуется с данными [36]. Остатки Phe319 и Cys253 располагаются с противоположных сторон от плоскости 8-охоG, тогда как остатки Gly42, Gln43, Phe45 взаимодействуют с краем большой бороздки, узнавая протонированный атом N7 8-охоG. Амидный атом кислорода Gln315 образует водородные связи с N1-имино- и N2-аминогруппами кольца, участвующего в спаривании оснований. Остаток Phe319 принимает различные конформации в свободной и связанной с ДНК форме hOGG1 (рис. 5A). В комплексе с ДНК ароматическое кольцо остатка Phe319 располагается почти перпендикулярно той ориентации, которая была у него в свободной форме. У остатка Gln315 в свободном ферменте боковая цепь располагается под ароматическим кольцом остатка Phe319 (рис. 5A). В связанном с ДНК состоянии амидный атом азота этого остатка вовлекается в образование системы водородных связей, в которой участвует также карбонильный атом кислорода остатка Pro266, располагающийся с другой стороны от кольца 8-охоG. В результате конформация фермента существенно

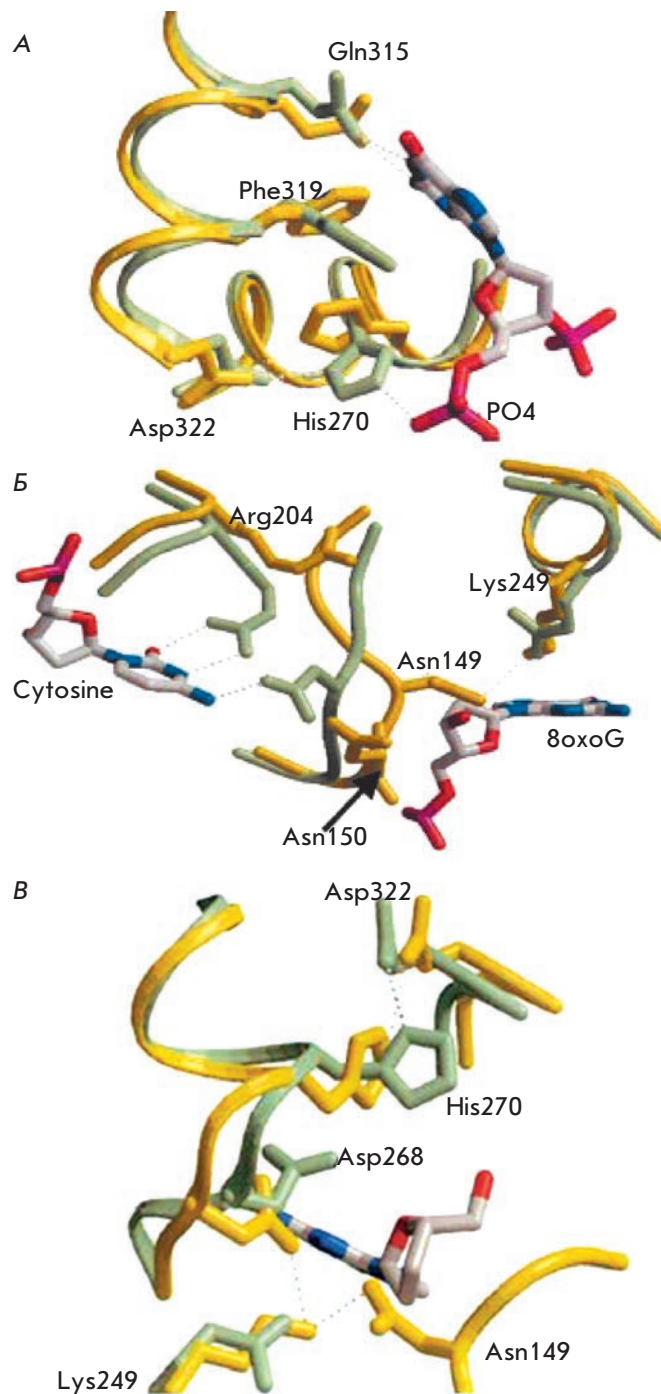


Рис. 5. Узнавание основания 8-охоG hOGG1 (желтым цветом обозначен свободный фермент, а светло-зеленым – связанный с ДНК). А – конформация остатка His270 в свободной и связанной с ДНК структурах. Участие остатков Gln315, Phe319 и Asp322 в образовании кармана для связывания 8-охоG. Б – участие остатка Asn149 в узнавании и связывании комплементарного цитозина. В – конформационные изменения остатков Asp268 и His270 в процессе связывания 8-охоG. (Приведено с разрешения Elsevier Science Ltd.: [J. Mol. Biol.] Bjørås M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. J. Mol. Biol. 2002. V. 317. P. 171–177, copyright 2002)

меняется, создавая тесный карман для связывания поврежденного основания 8-охоG.

В данной работе [35] несколько иначе была интерпретирована роль остатка His270. Установлено, что конформационные изменения фермента в области кармана, связывающего гетероциклическое основание, сопровождаются изменением ориентации His270, который образует две водородные связи в комплексе с ДНК: одну – между атомом азота N2 имидазольного кольца с 5'-фосфатной группой 8-охоG, вторую – между атомом азота N1 и карбоксильной группой остатка Asp322 (рис. 5А). В свободном ферменте, хотя и сохраняется одна водородная связь с Asp322, имидазольное кольцо остатка His270 отклоняется более чем на 90° по сравнению со связанной с ДНК конформацией; встраивается напротив фенильного кольца остатка Phe319 и образует два слоя сэндвича, закрытого остатком Gln315. Такое вращение остатка His270 несовместимо с конформациями остатков Phe319 и Gln315, которые необходимы для специфического связывания 8-охоG в комплексе с ДНК. Конформации боковых заместителей остатков Phe319 и Gln315 определяются конформацией остатка His270, которая сама в комплексе с 8-охоG-ДНК определяется взаимодействием с 5'-фосфатной группой 8-охоG-нуклеотида. Таким образом, связывание с hOGG1 рибозофосфатного остова ДНК определяет конформацию остатка His270, который, в свою очередь, вызывает конформационные изменения в остатках Phe319 и Gln315, что позволяет окисленному основанию связаться в специфическом кармане.

Следовательно, боковые цепи заместителей в остатках Phe319, Gln315 и His270 действуют как единое целое, переключаясь между закрытым и открытым состояниями при связывании 8-охоG-нуклеотида.

В свободном ферменте область аминокислотных остатков 146–151 принимает конформацию, отличную от конформации в комплексе с ДНК; сдвиг соответствующих атомов достигает 4–9 Å в связанной с ДНК структуре. Наиболее существенные изменения происходят в центре этого сегмента, где боковая цепь остатка Asn149 в свободном ферменте направлена назад в сторону фермента и образует водородные связи между амидным атомом кислорода и ε-аминогруппой каталитического остатка Lys249 (рис. 5Б). Однако при образовании комплекса с 8-охоG-ДНК этот атом кислорода перемещается на ≈ 9 Å, чтобы осуществить взаимодействие с удаленным остатком цитозина. Остальные остатки аспарагина в триplete NNN, 150 и 151, чьи водородные связи в комплексе с ДНК стабилизируют цитозинузнающий фрагмент белка, в свободном ферменте направлены в раствор. Кон-

формация этого внутриспирального пептида в свободном ферменте не подходит для связывания 8-охоG в экстраспиральной конформации. Как встраивание сегмента белка в ДНК, так и встраивание в белок вырезаемого нуклеотида требуют сопутствующих этим процессам перестроек структуры белка.

Одно из важных последствий реориентации остатка His270 в комплексе фермента hOGG1 с 8-охоG-ДНК – небольшое перемещение участка спирали и цепи между остатками Pro266 и Trp272, которое сдвигает боковую цепь остатка Asp268 на расстояние более 1.5 Å по сравнению с ее расположением в свободном ферменте (рис. 5В).

В структуре комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей F-лиганд [33], остаток Lys249 удален от карбоксильной группы Asp268, что делает сомнительным предположение о ее роли в депротонировании нуклеофила и тем самым указывает на альтернативную функцию этого остатка в стабилизации заряженного переходного состояния дезоксирибозного кольца. Кроме того, в ДНК-связанной структуре карбоксильная группа Asp268 и имидазольная группа His270 достаточно сближены и могут образовать слабую водородную связь, которая также способна облегчать отрыв протона с помощью Asp268, обеспечивая тем самым ее косвенное участие в катализе. С другой стороны, в структуре свободного hOGG1 боковые цепи остатков Asp268 и His270 удалены на расстояние >4 Å и расположены совершенно неоптимально для образования между ними водородной связи (рис. 5В). В противоположность этому боковые цепи остатков Lys249 и Asp268 расположены оптимально для образования водородной связи между ε-амино- и карбоксильными группами соответственно и дополнительной водородной связи между ε-аминогруппой Lys249 и атомом кислорода бокового заместителя в остатке Asn149 (рис. 5В). Конфигурация боковой цепи остатка Lys249 в активном центре соответствует протонированной форме ε-аминогруппы, стабилизированной нейтральной водородной связью с атомом кислорода амидной группы остатка Asn149 и водородной связью с депротонированным карбоксилем боковой цепи остатка Asp268.

В соответствии с механизмом катализа, предложенном для OGG1 [29–31], остаток Lys249 осуществляет нуклеофильную атаку по атому углерода C1' дезоксирибозного кольца, замещая основание 8-охоG и образуя ковалентный интермедиат – основание Шиффа [39]. Протонированная боковая группа остатка Lys249 в свободном ферменте не способна осуществить такую функцию, которая требует присутствия неподеленной пары электронов, как в нейтральной ε-NH₂. Поэтому остаток Lys249 должен быть депротонирован для того, чтобы могла пройти эта реакция.

Это возможно лишь в том случае, если взаимодействие с остатком Asp268, стабилизирующее протонированное состояние остатка Lys249, исчезает при связывании с субстратом.

Согласно [35], связывание с нуклеозидом 8-охо-dG способствует изменению положения остатка Asp268 (через перемещение остатков Phe319 и Phe270), что приводит к разрыву его ион-парной/водородной связи с остатком Lys249. Параллельно, для того, чтобы осуществить взаимодействие фермента с остатком цитозина комплементарной цепи, происходит выворачивание межспиральной петли и разрыв водородной связи между остатком Lys249 и боковой карбоксильной группой остатка Asn149. Вследствие исчезновения этих нейтрализующих взаимодействий существование протонированной формы ϵ -аминогруппы остатка Lys249 должно быть невыгодным по сравнению с нейтральной формой, образующейся в результате отрыва протона карбоксильной группой остатка Asp268 одновременно с его перемещением и исчезновением водородной связи с остатком Lys249.

Таким образом, сделан вывод [35], что водородные связи, образованные остатками Asp268 и Asn149 с протонированным атомом азота ϵ -аминогруппы остатка Lys249, служат триггерными замками в свободном ферменте; одна водородная связь связана с узнаванием 8-охоG, другая – цитозина, и обе должны исчезнуть для того, чтобы фермент был готов к нуклеофильной атаке по атому C1' дезоксирибозы ДНК.

РОЛЬ ОСТАТКА Asp268 В КАТАЛИТИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ hOGG1

Остаток Asp268 каталитически важен как для hOGG1, так и для всего структурного семейства, к которому принадлежит этот белок [26, 44]. Замена остатка Asp268 на Ala или Asp приводят к потере гликозилазной и AP-лиазной активностей, однако ДНК-связывающая активность почти не меняется.

Достаточно давно было высказано предположение, что Asp268 может сопровождать вырезание основания путем депротонирования остатка Lys249, тем самым превращая нереакционноспособную катионную форму в нуклеофильный нейтральный амин [36]. Однако против такой его роли свидетельствует факт, что остаток Asp, находящийся на конце α -спирали белка, должен быть менее основным на несколько порядков величины; стабильное положение должно полностью препятствовать вращению Asp268 вокруг связи C ^{α} –C ^{β} для осуществления взаимодействия с Lys249. В кристаллической структуре фермента дикого типа в комплексе с AP-ДНК [33] показано, что взаимодействие между остатками

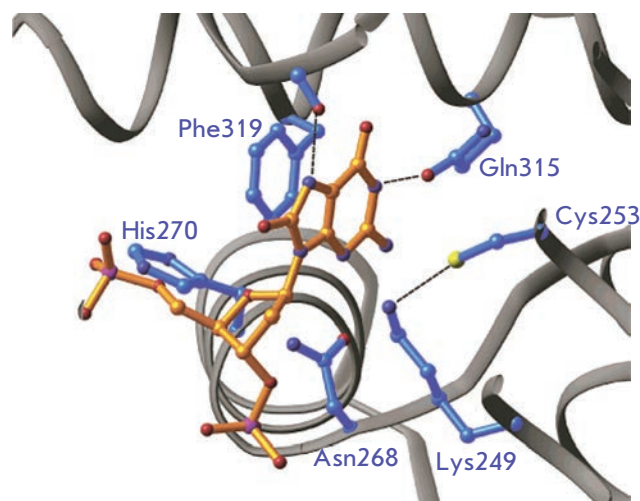


Рис. 6. Структура активного центра мутанта hOGG1 D268N в составе комплекса с ДНК-дуплексом, содержащим 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1N3C [38] (Приведено с разрешения American Chemical Society: [Biochemistry] Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. Biochemistry. 2003. V. 42. P. 1564–1572, copyright 2003)

Asp268 и Lys249 отсутствует. Действительно, только в структуре свободного белка эти два остатка были связаны водородной связью, при этом остаток Asp268 сохраняет свое положение в α -спирали, а остаток Lys249 разворачивается, как на шарнире, чтобы обеспечить с ним контакт [35]. Важно то, что даже при ослабленном взаимодействии между остатками Glu268 и Lys249 (в мутантном белке с заменой D268E) и более длинной боковой цепи боковая цепь остатка Glu268 не взаимодействует с остатком Lys249. Можно предположить, что если за счет микроокружения рK_a остатка Lys249 понижается даже ненамного, то при этом получается некоторое количество нейтрального амина; этого может быть достаточно, чтобы вызвать разрезание гликозидной связи и удаление основания.

Для проверки участия остатка Asp268 в химических реакциях, катализируемых hOGG1, этот остаток заменяли на остатки аспарагина (D268N), глутамата (D268E) и глутамина (D268Q) [38]. Показано, что остаток Asp268, расположенный на N-конце α -спирали (рис. 6), выполняет двойственную функцию, катализируя протекание стадий удаления основания и разрыва цепи. Замена этого аминокислотного остатка на аспарагин приводила к сильному снижению ферментативной активности у hOGG1 с D268N. В кристаллической структуре этого мутанта впервые показано участие нуклеофильного остатка лизина

(Lys249) в узнавании поврежденного остатка G (8-охоG или F).

Анализ этой структуры позволил предположить, что удаление основания 8-охоG происходит через разрыв гликозидной связи и лишь последующее присоединение остатка Lys249 с образованием основания Шиффа между ϵ -NH₂-группой и C1'-атомом дезоксирибозы. С другой стороны, замены аспартата на глутамин (D268Q hOGG1) и глутамат (D268E hOGG1), хотя и дестабилизировали структуру (укладку) белка, но не приводили к потере каталитической активности.

Установлено [38], что структуры комплексов с ДНК у мутантных по остатку Asp268 форм hOGG1 близки к определенной ранее структуре комплекса мутанта с заменой K249Q [36]. Величина среднеквадратичного отклонения координат для структур белковых остовов мутантов hOGG1 D268N и K249Q составляет 0.32 Å, что с уверенностью позволяет говорить об идентичности структур. Если сравнивать структуры фермента дикого типа и мутанта hOGG1 D268E, связанного с F-аналогом, то величина среднеквадратичного отклонения составляет 0.45 Å и 0.59 Å для структур WT hOGG1/F и hOGG1 D268Q/F соответственно. Это свидетельствует о том, что в результате замены аминокислот активного центра в этих мутантах не происходит глобальных структурных перестроек. Во всех трех структурах единственные серьезные перестройки происходили в области активного центра, а именно, в положении первых трех аминокислот α -M-спирали (остатки 269, 270 и 271). Во всех трех структурах нуклеофильная ϵ -NH₂-группа остатка Lys249 имеет примерно фиксированное положение в кристалле, хотя она и находится на конце длинной алкильной цепи. В этой структуре ϵ -NH₂-группа остатка Lys249 расположена вблизи атома C1' дезоксирибозы (3.4 Å), однако не на траектории, подходящей для прямой нуклеофильной атаки по гликозидной связи (рис. 6). По этим данным ϵ -аминогруппа остатка Lys249, по-видимому, образует водородную связь с сульфгидрильной группой аминокислоты Cys253, которая, наоборот, находится на ван-дер-ваальсовском расстоянии от π -системы основания 8-охоG. Из-за того, что остаток Cys253 расположен над верхней поверхностью рибозы, остаток Lys249 не может осуществить контакт с остатком Cys253 при атаке сахара с нижней стороны. В то время как в ферменте дикого типа карбоксильный кислород остатка Asp268 образует водородную связь с боковой цепью остатка His270, в мутанте D268N NH₂-амидная группа остатка Asn268 расположена слишком далеко от остатка His270 для образования водородной связи. Отсутствие такого взаимодействия позволяет объяснить сравнительно слабое связывание ДНК с му-

тантом D268N, поскольку остаток His270 напрямую взаимодействует с фосфатным остовом с 5'-стороны от повреждения. Остальная часть активного центра и узнающего основание кармана в структурах мутантных hOGG1 с заменами D268N и K249Q, связанных с 8-охоG-содержащей ДНК, идентична.

Альтернативное предположение о роли остатка Asp268 – это электростатическая стабилизация с помощью остатка Asp268 положительного заряда на атоме O4' в переходном состоянии дезоксирибозы в реакции удаления основания [33]. С этой точкой зрения согласуется тот факт, что во всех структурах hOGG1, имеющих в положении 268 остаток Asp, карбоксильный атом кислорода располагается вблизи атома O4' сахарофосфатного остова ДНК, примерно на расстоянии 3.2 Å. Вследствие сильного взаимодействия с собственной α -спиралью ориентация боковой цепи Asn268 в мутантной форме D268N почти такая же, как и у остатка Asp268 в ферменте дикого типа. Следовательно, замещение остатком Asn положения 268 приводит к замене отрицательно заряженного атома кислорода на нейтральную NH₂-группу с тем же расположением в активном центре. Расстояние между амидным азотом остатка Asn268 и атомом O4' дезоксирибозного кольца (3.4 Å) больше, чем можно было ожидать при наличии водородной связи между этими атомами, однако этого достаточно, чтобы атом O4' отчасти испытывал влияние положительного электростатического поля амидных протонов остатка Asn268. Поэтому полагают [33], что замена заряда на противоположный знак от Asp (δ^-) на Asn (δ^+) в положении 268 способствует повышению энергии переходного состояния в реакции удаления основания вследствие увеличения положительного заряда на O4', что приводит к значительному уменьшению скорости этой реакции.

Таким образом, показано [38], что форма hOGG1, содержащая вместо остатка аспартата Asp268 аспарагин (D268N), абсолютно неактивна. Аминокислотные замены D268Q или D268E, хотя и приводили к менее выгодной конформации фермента, но не снижали каталитическую активность. Полученные данные опровергают высказанное ранее [36] предположение о роли остатка Asp268 как кислотного/основного катализатора hOGG1, однако они подтверждают его участие в формировании заряда на атоме O4' дезоксирибозы при 8-охоG в ходе стадии вырезания основания.

МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО ОСНОВАНИЯ 8-охоG

Структура гетероциклических оснований 8-охоG и G отличается только по двум положениям: атом C8 связан с атомами O или H, N7 содержит атом H

или неподеленную пару электронов соответственно. По этой причине атом Н при атоме N7 в 8-охоG имеет возможность образовывать водородную связь с карбонилем основной цепи остатка Gly42, тогда как у G такой возможности нет. Для того чтобы детальнее разобраться в структурных особенностях взаимодействия фермента hOGG1 с окисленным основанием 8-охоG и неповрежденным G, изучали взаимодействие с ДНК-субстратами мутантной формы hOGG1 N149C, у которого полностью отсутствует каталитическая активность [37]. Остаток Cys149 через дисульфидную связь соединяли линкером с атомом C4 в остатке цитозина, комплементарного 8-охоG. Это позволяло ограничить возможность диссоциации белка из комплекса с ДНК. Получены кристаллические структуры комплексов N149C hOGG1 с 8-охоG-, G- и 7-деза-G-содержащими ДНК-дуплексами.

Обнаружено, что в комплексах hOGG1 с 8-охоG- и G-содержащими ДНК изгиб спирали ДНК в месте выворачивания нуклеотида составляет $\sim 70^\circ$ и $\sim 80^\circ$ соответственно. Основание 8-охоG при этом погружено глубоко в узнающий повреждение карман фермента, а G выталкивается из этого кармана и лежит на поверхности фермента в «экзосайте», расположенном на расстоянии примерно 5 \AA от кармана фермента (рис. 7А,Б). Основание G взаимодействует с двумя остатками активного центра Phe319 и His270, но эти контакты отличаются от тех, что имеют место в случае 8-охоG. В комплексе с 8-охоG-субстратом остаток His270 не контактирует с этим основанием, а образует водородную связь с его 5'-фосфатом. В комплексе с G-содержащей ДНК His270 взаимодействует с π -системой основания, но не образует водородной связи с фосфатом.

Оценка свободной энергии взаимодействия остатков 8-охоG и G с активным центром фермента hOGG1 (ΔA_1 и ΔA_2 соответственно), проведенная в [37] с использованием компьютерного моделирования по методу квантовой механики/молекулярной механики, показала, что свободная энергия дискриминации поврежденного основания $\Delta \Delta A = \Delta A_1 - \Delta A_2$ равна -6.8 ккал/моль, что соответствует 10^5 -кратному предпочтительному связыванию в активном центре остатка 8-охоG по сравнению с G.

Водородная связь, образующаяся между карбонильным атомом кислорода остатка Gly42 и протоном при атоме N7 в 8-охоG, сильно стабилизирует структуру комплекса. В случае G – вместо нее будет кулоновское отталкивание между карбонилем остатка Gly42 и неподеленной парой электронов атома N7, если остатки G и Gly42 будут занимать в комплексе те же положения, что и в комплексе с 8-охоG.

Данная работа [37] позволяет глубже понять механизм узнавания поврежденного основания. Выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии как согласованный процесс. Скорее всего, он протекает через образование серии дискретных состояний. Этот вывод основан на том, что комплекс фермента hOGG1 с G-субстратом может имитировать интермедиат, образующийся с 8-охоG-субстратом, непосредственно перед выворачиванием основания в карман активного центра. Многостадийный характер механизма узнавания повреждения в ДНК ферментом hOGG1 доказан также в исследованиях динамики конформационных переходов путем регистрации флуоресценции остатков Trp в белке и 2-аминопурина в ДНК [45, 46].

Сравнение конформаций комплексов фермента с G- и 8-охоG-содержащей ДНК позволяет понять, что происходит на последней стадии выворачивания основания. Со стороны 3'-конца (слева) от данного нуклеотида структуры комплексов очень похожи. В них сохраняется контакт за счет водородных связей со структурой HhH, содержащей остатки Gly245, Gln249 и Val250, а также сохраняется электростатическое взаимодействие с ионом двухвалентного металла (рис. 7А). Единственным исключением является состояние 3'-фосфата внеспирального нуклеотида, который образует водородную связь с остатком Lys249 в G-комплексе; тогда как в комплексе, содержащем 8-охоG, остаток Lys249 не может участвовать во взаимодействии с 3'-фосфатом, а должен быть повернут в сторону активного центра для того, чтобы принять участие в каталитической стадии. Предполагается [37], что контакты с 3'-стороны от повреждения, возможно, даже контакт 3'-фосфата ДНК с остатком Lys249, устанавливаются раньше, чем фактически произойдет выворачивание поврежденного основания. С 5'-стороны от внеспирального нуклеотида конформации спирали различаются для G- и 8-охоG-структур. Следовательно, в комплексе с G-ДНК имеет более выраженный изгиб спирали ($\sim 80^\circ$ по сравнению с $\sim 70^\circ$); дуплекс с 5'-стороны также сильнее повернут, примерно на $\sim 20^\circ$ вокруг оси спирали (рис. 7Б). Эта разница возникает из-за потери водородных связей, образованных между 3'- и 5'-фосфатами и NH-группой основной цепи остатка Asn150 и NH-группой боковой цепи остатка His270 в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК. Двухвалентный катион Ca^{2+} , который координирует 3'-фосфат и стабилизирует изгиб за счет внутри- и внешнесферных контактов с внеспиральным нуклеотидом, в G-комплексе также отсутствует (рис. 7А). Эти контакты устанавливаются в 8-охоG-комплексе только после выворачивания поврежденного нуклеотида в узнающий карман фермента.

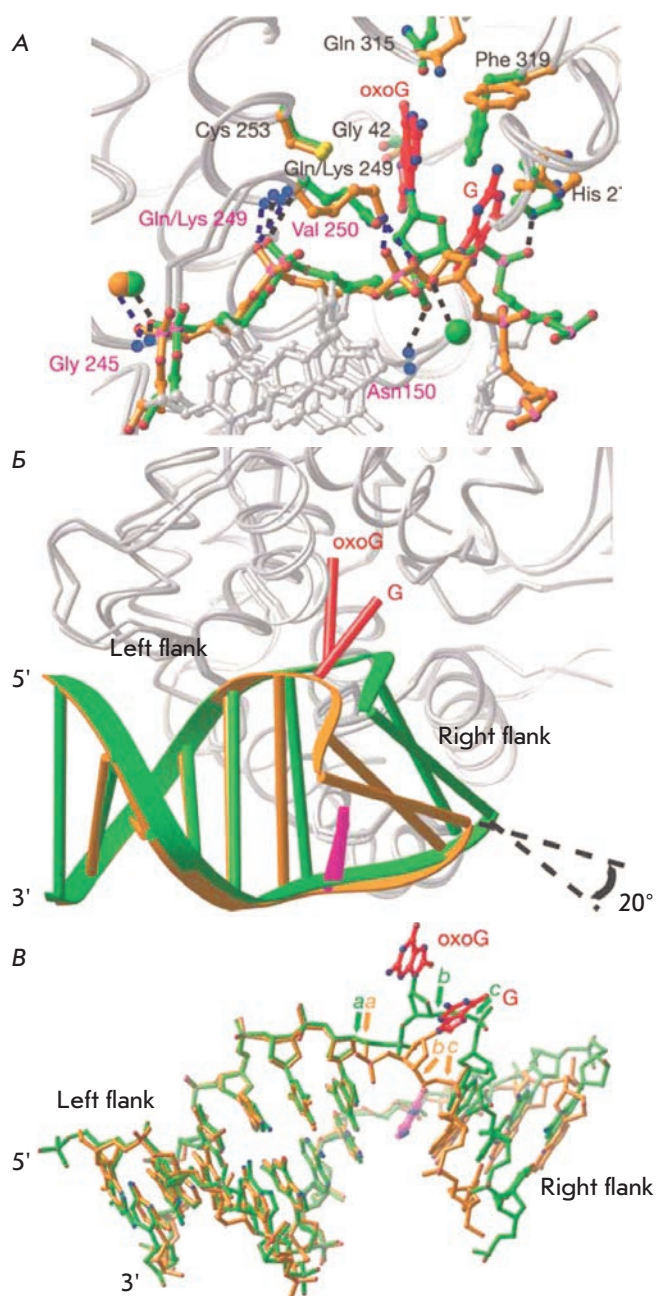


Рис. 7. Наложение структур N149C hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим либо 8-охоG (зеленый цвет), либо G (желтый цвет). А – расположение остатков активного центра фермента при взаимодействии с основаниями 8-охоG и G. Б – изменение структуры ДНК-дуплекса в зависимости от связывания поврежденного и неповрежденного оснований. В – изменение геометрических параметров ДНК в области связывания с ферментом. Желтыми и зелеными стрелками обозначены валентные связи, претерпевающие существенное вращение: $+110^\circ$ (стрелка а) для связи C4'–C5' с 3'-конца от 8-охоG, $+119^\circ$ (стрелка б) для связи C4'–C5' 8-охоG, -151° (стрелка с) для связи P–O5'. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Nature. 2005. V. 434. P. 612–618, copyright 2005)

С учетом прогресса в понимании структурных основ высокой специфичности фермента по отношению к поврежденному основанию остается непонятным, как фермент hOGG1 узнает 8-охоG внутри ДНК-спирали. Согласно [47], решение этого вопроса заключается в идентификации вариантов hOGG1, способных узнавать внутриспиральное поврежденное основание, но значительно снижать способность связывания внеспирального повреждения.

В работе [47] был проведен анализ структуры форм hOGG1, содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 8-охоG. Как и в предыдущих работах [37], авторы использовали технологию межмолекулярных дисульфидных шивков для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом C4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину. Показано, что мутации по остатку His270, который образует контакт с 5'-фосфатом (форма hOGG1 H270A), по остатку глутамина Gln315, взаимодействующему с внешней поверхностью двухцепочечной ДНК (форма hOGG1 Q315A), не влияют на структуру фермента, но лишают его функциональности.

С другой стороны, замена остатка Gly42, формирующего специфический, показанный ранее [36] контакт с 8-охоG, на остаток аланина (форма hOGG1 G42A) приводит к появлению препятствия для связывания 8-охоG в области контактной поверхности между ДНК и hOGG1. Как уже отмечалось выше, Gly42 – единственная аминокислота в hOGG1, которая непосредственно «оценивает» структурную разницу между G и 8-охоG: атом N7 8-охоG образует водородную связь с карбонильным кислородом остатка Gly42 [37]. Замена атома водорода при C_α-атоме остатка Gly42 гораздо более объемной метильной группой аланина (форма hOGG1 G42A) вносит существенные стерические затруднения при связывании 8-охоG в активном центре фермента (рис. 8А); такое связывание вызывает конформационные реорганизации в структуре аминокислотной последовательности hOGG1.

При введении аминокислотной замены Q315F, которая стерически препятствовала связыванию 8-охоG в кармане активного центра, получены две структуры: Q315F*149 и Q315F*292, в которых цитозин комплементарной цепи был ковалентно связан с остатками цистеина 149 и 292 соответственно. Белок hOGG1 Q315F*149 действительно не связывал остаток 8-охоG в кармане активного центра, а только в экзосайте (рис. 8Б). Однако мутант Q315F*292 позволял остатку 8-охоG почти полностью погружаться в узнающий карман, так что могли образоваться водородные связи между остатком Gly42 и 8-охоG N7-H (рис. 8В). Авторы данной работы полагают, что в этой

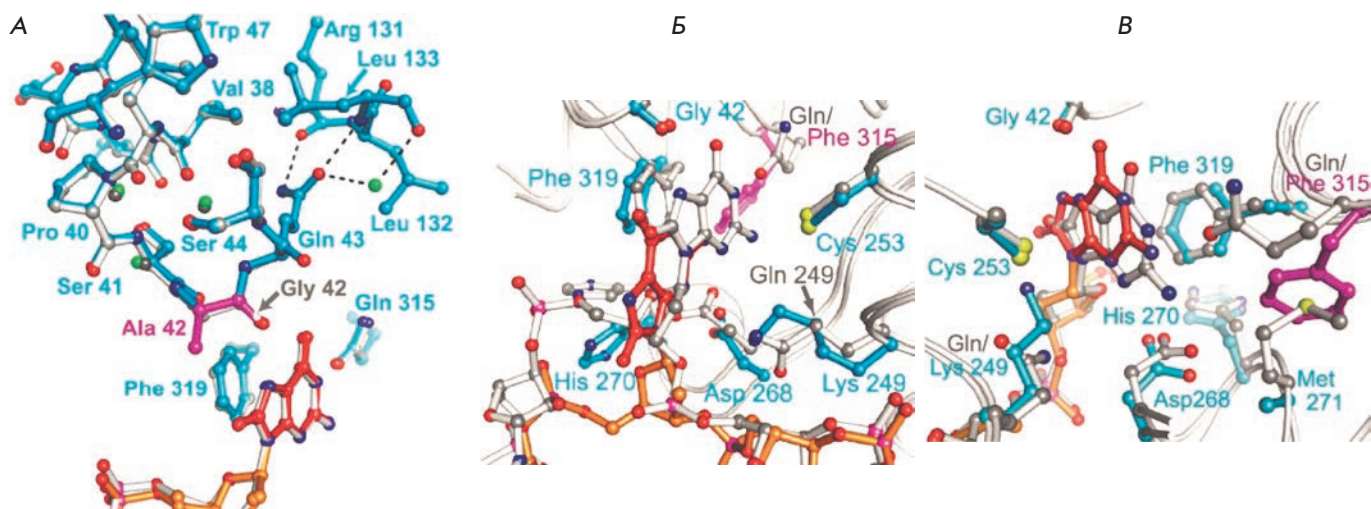


Рис. 8. Изменения в расположении аминокислот активного центра hOGG1 в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК вследствие введения замен по аминокислотам, участвующим в формировании контактов с 8-охоG. А – наложение остатков аминокислот активного центра hOGG1 для WT (серый остов) и мутантной формы G42A (синий остов). Б – аминокислоты активного центра для структуры Q315F*149; остаток 8-охоG в WT hOGG1 показан серым цветом, в Q315F – красным. В – аминокислоты активного центра в структуре Q315F*292. (Приведено с разрешения The American Society for Biochemistry and Molecular Biology: [J. Biol. Chem.] Radom C.T., Banerjee A., Verdine G.L. J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 9182–9194, copyright 2007)

структуре за счет ковалентной сшивки с удаленным остатком Cys292 стабилизируется слабое взаимодействие основания 8-охоG с узнающим повреждение карманом. Несмотря на то что в этой структуре остаток 8-охоG погружен в карман активного центра, не происходит его отрыва от ДНК. Необходимо также отметить, что замена остатка Gln на Phe в мутантной форме hOGG1 Q315F вызывала полную потерю специфичности hOGG1 при связывании как 8-охоG-содержащей, так и неповрежденной ДНК.

С целью детального выяснения роли отдельных остатков аминокислот, участвующих в связывании 8-охоG в активном центре фермента hOGG1, был синтезирован фотоактивируемый аналог 8-охоG, несущий на атоме кислорода, находящемся при C6 в остатке 8-охоG, ортонитрофенилизопропильную группу (PC) [32]. Использование такого производного в составе ДНК-субстрата в сочетании с остановкой реакции быстрым замораживанием позволило структурно охарактеризовать один из наиболее поздних интермедиатов, образующихся в ходе процесса эксцизионной репарации оснований (BER).

Комплекс фермента с PC-субстратом имел такую же структуру, как и комплекс с G-субстратом, т.е. модифицированное PC-основание располагалось в экзосайте фермента hOGG1 [37]. При облучении кристалла этого комплекса светом с длиной волны 373 нм при 4°C в течение 30 с происходило отщепление ортонитрофенилизопропильной группы с об-

разованием продукта, содержащего пару 8-охоG/C (FC-комплекс). Дальнейшее быстрое замораживание в жидком азоте и анализ полученной структуры показали, что полученное основание 8-охоG оказывается в кармане активного центра в том же положении, что и в комплексе hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК [36, 47].

При этом сохранился контакт, определяющий проявление специфичности узнавания 8-охоG ферментом, образованный за счет водородной связи между атомом N7 основания 8-охоG и карбонильным атомом кислорода основной цепи остатка Gly42; хотя длина этой связи была больше, чем в комплексе с 8-охоG-субстратом (LRC-комплекс, 3.4 против 2.8 Å) (рис. 9).

Какого-либо другого контакта 8-охоG с ключевыми аминокислотами не обнаружено. Три ключевые аминокислоты в hOGG1, играющие важную роль в формировании контактов с 8-охоG, а именно остатки Phe319, Cys253 и Gln315, в FC-комплексе находились в других положениях, чем в полученных ранее структурах [36, 47] (см. рис. 4, рис. 9А). Кроме того, дополнительный контакт между остатком His270 и 5'-фосфатом 8-охоG, имеющийся в LRC-комплексе, в FC-комплексе отсутствовал. Вместо этого остаток His270 находился в стэкинге с Phe319, тогда как водородной связи между остатками His270 и Asp322, присутствующей в FC-комплексе, не было в LRC-комплексе с 8-охоG-субстратом. Каталитически значимая нуклеофильная боковая цепь остатка Lys249

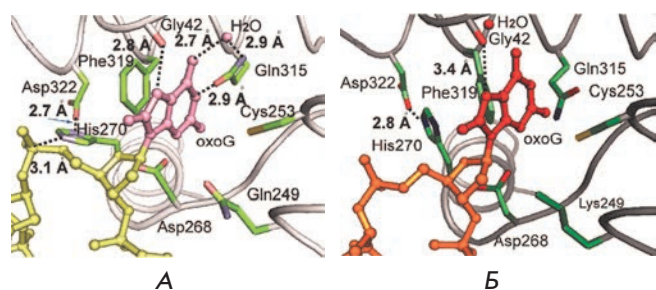


Рис. 9. Расположение остатков аминокислот активного центра относительно 8-охоG в LRC-комплексе [36] (А) и FC-комплексе (Б). (Приведено с разрешения American Chemical Society: [J. Am. Chem. Soc.] Lee S., Radom C.T., Verdine G.L. J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 7784–7785, copyright 2008)

в FC-комплексе дезориентирована и не вовлечена в образование ключевого солевого мостика с остатком Cys253 (Lys249(NH₃⁺)/Cys253(S⁻)), который был предсказан расчетным путем [37] для стадии узнавания основания 8-охоG. Это различие между FC- и LRC-комплексами не ограничивается расположением боковых заместителей перечисленных аминокислот. Спираль α-О, в которой находятся три аминокислотных остатка активного центра, Gln315, Phe319 и Asp322, также оказывается отодвинутой от активного центра (рис. 9Б).

Таким образом, изученная в данной работе структура комплекса относится к интермедиату, наиболее позднему среди когда-либо исследованных для ДНК-гликозилаз, в котором основание 8-охоG почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрел конечную каталитически активную конформацию (см. также [46]).

Показано [32], что попадание поврежденного основания из экзосайта в активный центр фермента происходит намного быстрее, чем последующая реорганизация аминокислот активного центра, необходимая для образования каталитически компетентного состояния.

В дальнейшем отработанную ранее [37, 47] технологию межмолекулярных дисульфидных сшивок использовали для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом С4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину в ДНК-дуплексе [48]. Такая техника позволяла добиваться образования комплекса между ферментом и ДНК в процессе получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Была закристаллизована и получена структура hOGG1, в которой неповрежденный гуанин был вывернут из двухцепочечной спирали ДНК и помещен в активный центр фер-

мента [48]. В таком комплексе не происходило расщепления N-гликозидной связи. Эта неспособность катализировать расщепление гликозидной связи не была обусловлена структурным влиянием дисульфидной сшивки между ДНК и ферментом, поскольку замена G на 8-охоG в этом же комплексе приводила к эффективному вырезанию окисленного нуклеотида. Полученные данные указывают на существование механизма позднего предотвращения вырезания азотистого основания G, которое ошибочно попало в активный центр hOGG1. Подобный механизм включается только в тех редких случаях, когда гуанин преодолевает энергетический барьер перемещения из экзосайта в карман активного центра. Механизм, на котором основано предотвращение вырезания G, пока остается неясным. Ранее было показано, что N-гликозидная связь при G более лабильна при нейтральных значениях pH, чем при 8-охоG [49]. Следовательно, механизм дискриминации, который опирается на различиях в лабильности N-гликозидной связи с G по сравнению с 8-охоG, в данном случае не может служить объяснением.

Получено также подтверждение существования механизма позднего предотвращения вырезания G [46]. В этом исследовании с помощью метода остановленной струи была проанализирована эффективность каталитического действия hOGG1 на ДНК-субстраты различной специфичности. Сочетание регистрации изменений собственной флуоресценции остатков триптофана в ферменте и флуоресценции введенных в ДНК остатков 2-аминопурина позволяло одновременно следить как за динамикой ДНК, так и за изменением структуры фермента. В работе использовали ДНК-дуплексы, не содержащие и содержащие окисленный гуанин – 8-охоG-субстрат и G-лиганд соответственно. При связывании с hOGG1 ДНК-дуплексов была зарегистрирована (по увеличению интенсивности флуоресценции остатка 2-аминопурина) дестабилизация двойной спирали ДНК на временах ~10 и 20 мс соответственно, что объяснялось изгибанием ДНК и выворачиванием гетероциклических оснований G или охоG из спирали [46]. На временах > 20 мс в случае охоG-субстрата происходило уменьшение интенсивности флуоресценции 2-аминопурина, которое, вероятно, соответствовало погружению аминокислотных остатков белка в полость в двойной спирали и стабилизации такого комплекса. Аналогичного изменения интенсивности 2-аминопурина не наблюдалось в случае G-лиганда. Это означало, что связывание hOGG1 с неспецифической ДНК может привести к изгибанию ДНК и выворачиванию G в экзосайт фермента, но механизм позднего предотвращения вырезания G отключает

стадию перехода фермента в каталитически компетентное состояние.

Verdine G.L. и соавт. [48] полагают, что положение уровня энергии переходного состояния для расщепления N-гликозидной связи в G может быть выше, чем для 8-охоG вследствие либо смещения основных элементов активного центра, либо отсутствия стабилизации переходного состояния (фермент-G)[‡] через образование водородной связи с остатком Gly42. Кроме того, ориентация G в активном центре слегка отличается от ориентации 8-охоG, полученной ранее [37]. Это может помешать достижению оптимального конформационного состояния для атаки боковой аминокислотной группы остатка Lys249 по C1'-положению дезоксирибозы. Эту гипотезу хорошо подтверждают предыдущие результаты, когда введение аминокислотных замен узнающего кармана, которые даже немного изменяли его геометрию: D268N [38] и Q315F [47], приводило к сильному (но не полному) падению эффективности катализа hOGG1.

В работе Lukina M.V. и соавт. [50] получены формы hOGG1 C253L и C253I, в которых карман активного центра закрыт вследствие замены остатка Cys253 на более объемные лейцин либо изолейцин. Несмотря на то что введение такой мутации искажало геометрию активного центра и значительно снижало каталитическую активность hOGG1, к полному подавлению ферментативной активности белка такая мутация не приводила. Полученные результаты хорошо согласуются с концепцией пластичности активного центра, которая предполагает, что активный центр hOGG1 структурно достаточно лабилен, чтобы частично компенсировать искажения, вызванные мутацией [50].

Полученный в работе [48] надмолекулярный ансамбль структурно весьма похож на комплекс, в котором hOGG1 выщепляет из ДНК основание 8-охоG. Различия этих комплексов во взаимодействии с основаниями G и 8-охоG обусловлены, возможно, лишь расхождениями на уровне тонкой подстройки структуры активного центра. Полагают, что во время поиска повреждений в ДНК hOGG1 может иногда выворачивать неповрежденный гуанин в свой активный центр [48]. Полученные результаты позволяют предполагать, что такие случайные попадания G в активный центр hOGG1 не приводят к расщеплению N-гликозидной связи вследствие способности различать 8-охоG и G на уровне катализа.

Существует гипотеза, что фермент hOGG1 «чувствует» измененную динамику в комплементарной паре 8-охоG-C как следствие измененных динами-

ческих свойств этой пары по сравнению с парой G-C. Это предположение было проверено путем сравнения времен спонтанного открытия комплементарных пар оснований в двойной спирали ДНК с помощью ЯМР-спектроскопии протонного обмена [51]. Оказалось, что скорость спонтанного открытия 8-оксогуанина и время жизни основания во внеспиральном состоянии такие же, как и у канонической пары гуанин-цитозин. Этот факт позволяет предположить, что динамика раскрытия комплементарных пар оснований не играет значительной роли в узнавании повреждения ДНК-гликозилазами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента репарации – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека – с ДНК-субстратами. Рассмотрены как опубликованные к настоящему моменту работы, так и данные о трехмерных структурах hOGG1, представленные в базе Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Показано, что важнейшими аминокислотами активного центра фермента, принимающими участие в катализе, являются Lys249 и Asp268. Аминокислоты, отвечающие за дискриминацию 8-охоG от G и вовлеченные в связывание окисленного основания в узнающем кармане – это Gly42, Asn149, Cys253, His270, Gln315, Phe319.

Обсужден структурно-динамический механизм удаления окисленных оснований из ДНК с помощью hOGG1. Показано, что выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии как согласованный процесс. По-видимому, он протекает через образование серии дискретных состояний. Интересной и плодотворной кажется гипотеза о том, что специфичность удаления поврежденного основания с помощью hOGG1 контролируется на всех этапах: на стадии узнавания повреждения, на этапе выворачивания его из дуплекса, в процессе связывания 8-охоG в узнающий карман фермента и на стадии каталитического гидролиза N-гликозидной связи. ●

Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-04-00013 (ОСФ), 14-04-00806 (ВВК), 14-04-00531 (ДГК)), программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 6.11), Советом по грантам Президента Российской Федерации (НШ-1205.2014.4 (ДГК)), Министерством образования и науки РФ (конкурс совместных лабораторий НГУ – ННЦ СО РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wallace S.S. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. № 1. P. 1–14.
2. Marnett L.J. // *Carcinogenesis*. 2000. V. 21. № 3. P. 361–370.
3. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. № 11. P. 1102–1115.
4. Boiteux S., Guillet M. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. № 1. P. 1–12.
5. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. // *FASEB J.* 2003. V. 17. № 10. P. 1195–1214.
6. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. // *Mutat. Res.* 2004. V. 567. № 1. P. 1–61.
7. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 9. P. 3096–3102.
8. Wan J., Bae M.-A., Song B.-J. // *Exp. Mol. Med.* 2004. V. 36. № 1. P. 71–77.
9. Gu Y., Desai T., Gutierrez P.L., Lu A.-L. // *Med. Sci. Monit.* 2001. V. 7. № 5. P. 861–868.
10. Raha S., Robinson B.H. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. № 10. P. 502–508.
11. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2002.
12. Jezek P., Hlavata L. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005. V. 37. № 12. P. 2478–2503.
13. Bernards A.S., Miller J.K., Bao K.K., Wong I. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 23. P. 20960–20964.
14. Kasai H., Nishimura S. // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 4. P. 2137–2145.
15. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. // *Nature*. 1991. V. 349. № 6308. P. 431–434.
16. Grollman A.P., Moriya M. // *Trends Genet.* 1993. V. 9. № 7. P. 246–249.
17. Michaels M.L., Miller J.H. // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. № 20. P. 6321–6325.
18. Fowler R.G., White S.J., Koyama C., Moore S.C., Dunn R.L., Schaaper R.M. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. № 2. P. 159–173.
19. Sakumi K., Furuichi M., Tsuzuki T., Kakuma T., Kawabata S., Maki H., Sekiguchi M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 31. P. 23524–23530.
20. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.-H., Wei Y.-F., Miller J.H. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 13. P. 3885–3892.
21. Lu R., Nash H.M., Verdine G.L. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 6. P. 397–407.
22. Cappelli E., Hazra T., Hill J.W., Slupphaug G., Bogliolo M., Frosina G. // *Carcinogenesis*. 2001. V. 22. № 3. P. 387–393.
23. Radicella J.P., Dherin C., Desmazes C., Fox M.S., Boiteux S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8010–8015.
24. Roldan-Arjona T., Wei Y.F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.P., Augustus M., Lindahl T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8016–8020.
25. Aburatani H., Hippo Y., Ishida T., Takashima R., Matsuba C., Kodama T., Takao M., Yasui A., Yamamoto K., Asano M. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 2151–2156.
26. Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7429–7434.
27. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 1637–1652.
28. Boiteux S., Radicella J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 377. P. 1–8.
29. Kow Y.W., Wallace S.S. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 25. P. 8200–8206.
30. Dodson M.L., Michaels M.L., Lloyd R.S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 52. P. 32709–32712.
31. Labahn J., Schäfer O.D., Long A., Ezaz-Nikpay K., Verdine G.L., Ellenberger T.E. // *Cell*. 1996. V. 86. № 2. P. 321–329.
32. Lee S., Radom C.T., Verdine G.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 25. P. 7784–7785.
33. Norman D.P.G., Bruner S.D., Verdine G.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 2. P. 359–360.
34. Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. № 3. P. 204–211.
35. Björås M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 317. № 2. P. 171–177.
36. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. // *Nature*. 2000. V. 403. № 6772. P. 859–866.
37. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. // *Nature*. 2005. V. 434. № 7033. P. 612–618.
38. Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 6. P. 1564–1572.
39. Nash H.M., Bruner S.D., Schäfer O.D., Kawate T., Addona T., Spohner E., Lane W.S., Verdine G.L. // *Curr. Biol.* 1996. V. 6. № 8. P. 968–980.
40. Thayer M.M., Ahern H., Xing D., Cunningham R.P., Tainer J.A. // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 16. P. 4108–4120.
41. Guan Y., Manuel R.C., Arvai A.S., Parikh S.S., Mol C.D., Miller J.H., Lloyd S., Tainer J.A. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 12. P. 1058–1064.
42. Björås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 20. P. 6314–6322.
43. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.6.0.0 Schrödinger, LLC.
44. Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. // *Biochem. J.* 1997. V. 325. Pt. 1. P. 1–16.
45. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 12. P. 3919–3931.
46. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 2. P. 1029–1038.
47. Radom C.T., Banerjee A., Verdine G.L. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 12. P. 9182–9194.
48. Crenshaw C.M., Nam K., Oo K., Kutchukian P.S., Bowman B.R., Karplus M., Verdine G.L. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 30. P. 24916–24928.
49. Bialkowski K., Cysewski P., Olinski R. // *Z. Naturforsch.* 1996. V. 51. № 1–2. P. 119–122.
50. Lukina M.V., Popov A.V., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Zharkov D.O. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 40. P. 28936–28947.
51. Every A.E., Russu I.M. // *J. Mol. Recognit.* 2013. V. 26. № 4. P. 175–180.

УДК 57.045 + 573.22

Протеом здорового человека при деятельности в экстремальных условиях

И. М. Ларина¹, В. А. Иванисенко², Е. Н. Николаев³, А. И. Григорьев¹¹Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76а²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10³Институт биохимической физики РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

*E-mail: irina.larina@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2014

РЕФЕРАТ В представленном обзоре рассмотрены новые подходы, присущие современной системной биологии, с позиций их использования для более глубокого понимания физиологической адаптации здорового человека в экстремальных условиях. Физиология человека в экстремальных условиях жизнедеятельности, или экологическая физиология, и системная биология являются естественными партнерами. Проанализированы сходство и отличия предмета и методов системной биологии от дисциплин OMICs (протеомики, транскриптомики, метаболомики) и других родственных наук. Обсуждаются последние данные, полученные методами системной биологии, по экологической физиологии человека. Отмечены отдельные достижения системной биологии в исследовании адаптации здорового человека к физической нагрузке, в том числе в высотных условиях, к влиянию гипоксии и окислительного стресса. Обоснован вывод о том, что применение методов и подходов системной биологии к изучению молекулярной картины адаптивных механизмов, формирующейся в организме человека во время космического полета, позволит получить ценные фундаментальные знания и пополнить картину метаболических путей человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интегративная физиология, космический полет, протеомика, системная биология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ OMICs – биологические дисциплины, объединенные в группу постгеномных технологий, названия которых заканчиваются на *-omics*; MALDI – метод лазерной десорбции/ионизации при содействии матрицы; ESI – ионизация электроспреем; PCR – полимеразная цепная реакция; HUPO – организация по изучению протеома человека; C-HPP HUPO – хромосомотрический проект изучения протеома человека; HLPP – проект изучения белков печени человека; KEGG DB – база данных «Киотская энциклопедия генов и геномов»; PGC-1 α – коактиватор 1 α рецептора γ , активируемого пролифераторами пероксисом; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; HSP70 – белок теплового шока 70 кДа; PDIA3 – белок 3 семейства А протеин-дисульфидизомеразы; АФК – активные формы кислорода; CV – коэффициент вариации.

ВВЕДЕНИЕ

Протеомика¹ возникла в самом конце XX века как совокупность методов широкомасштабного исследования белков [1]. Протеомика появилась в результате постепенного развития и усложнения классических методов исследования белков, начиная с гравиметрических и фотометрических до диск-электрофореза, градиентного и двумерного электрофореза [2–4]. Огромный скачок в темпах развития этой области произошел после открытия возможности использования масс-спектрометрии для идентификации белковых молекул. В конце

1980-х возникли новые методы ионизации белков без разрушения их первичной структуры – лазерная десорбция и ионизация при содействии матрицы (MALDI) и электроспрей (ESI) [5, 6]. В последние годы под термином «протеомика» понимают раздел системной биологии, изучающий белковый состав клеток, тканей, биологических жидкостей, организмов с преимущественным использованием высокопроизводительных методов масс-спектрометрии.

К настоящему моменту достигнут огромный прогресс в технологиях, которые позволяют идентифицировать белки, измерить их концентрацию в образце, определить распространенность в клетках,

¹ Термин впервые введен в 1997 году Р. James по аналогии с геномикой.

тканях и организмах, а также выявить их посттрансляционные модификации¹. Число пептидов и белков, которые могут быть идентифицированы и количественно определены, неуклонно растет (www.SwissProt.com).

Однако, несмотря на впечатляющие достижения внедрения масс-спектрометрических технологий в экспериментальную биологию, результаты, полученные протеомными методами, оказывают на медицину меньшее воздействие, чем полученные с помощью геномных исследований. По нашему мнению, это происходит, в первую очередь потому, что протеомные задачи сложнее из-за отсутствия методов размножения белковых молекул, подобных PCR, а также значительно большего (на много порядков величины) числа белков, чем генов. Хотя имеются и другие, также сложные, причины. Без сомнения, этот разрыв в практическом использовании замедляет темп, с которым выяснение генетических функций и других открытий в геномике претворяется в практическое знание и используется в клинической медицине.

РАЗВИТИЕ ПРОТЕОМИКИ: ДОСТИЖЕНИЯ И СЛОЖНОСТИ

Подробно состояние постгеномных OMICs², в том числе протеомики, обобщено в многочисленных обзорах [7–13]. Так, Lander [10] отмечает, что десятилетие постгеномной эры ознаменовалось интенсивным накоплением и каталогизацией данных о полных наборах компонентов клеток в результате интенсивного развития глобальных исследований структур геномов, протеомов, транскриптомов, метаболомов и др. «-омов». Однако существующий разрыв в структурных успехах и функциональном осмыслении – понимании функций, характеризующих жизнедеятельность, и их нарушений в патологических состояниях – обесценивает эти открытия. Критическим для продвижения к практике в настоящее время остается функциональный анализ [10]. С этим утверждением согласен и Alberts [8].

Что касается протеомики, то Vensimon и соавт. [7] выделяют в отставании практического внедрения ее достижений четыре причины концептуального и технического свойства. Во-первых, технологии масс-спектрометрии воспринимаются многими учеными как весьма сложные, основанные на использовании дорогого и постоянно трансформируемого (совершенствуемого) оборудования. То же самое относится и к геномике с ее высокопроизводительными технологиями, но получение результатов в протеом-

ном анализе носит нелинейный характер, использует несколько различных протоколов, поэтому методы протеомики действительно оказываются объективно более сложными. Суммируя, можно заключить, что достигнутый прогресс в протеомике тесно связан с совершенствованием методов масс-спектрометрии и увеличением степени доступности инструментов протеомики на основе масс-спектрометрии для широкого круга ученых, работающих в области протеомики и смежных областях. Действительно, анализ опубликованных данных показывает, что значительная доля высококачественных результатов в области протеомики генерируется относительно небольшим числом лабораторий. Отмечается [7], что сейчас достаточно уверенно поддаются идентификации от 7000 до 10000 белков человека, не считая мажорных (находящихся в образцах в высокой концентрации).

Когда анализ протеомов клеточных линий стал возможным, это направление привлекло внимание многих исследователей, однако суммарно в этих работах сообщается приблизительно только о 100 широко распространенных белках [14–17].

Во-вторых, исследования с использованием высокопроизводительных методов масс-спектрометрии, проводимые с целью выявления маркеров, не дают значительных преимуществ в случае метода, ориентированного на проверку определенной гипотезы (hypotheses driving research), который остается основным в науках о жизни. Повторяющиеся циклы экспериментов с построением гипотез и их проверкой, выполняемые с использованием протеомных наборов данных, на начальном этапе открытия маркеров пока не позволяют получить ожидаемую выгоду.

В-третьих, становится общепризнанным, что каталогизация белков в образце или прогнозирование их возможного синтеза с гена, расположенного в конкретной хромосоме (что является основной целью инициативы C-NPP проекта HUPO – геноцентрического изучения протеома человека), необходимы на настоящем этапе, но недостаточны для биологического понимания физического и функционального взаимодействия белков в условиях динамических молекулярных сетей, выяснение функции конкретных белков в которых так же важно, как выяснение структуры и функции отдельных белков [2, 10, 17]. Представление о том, что биологические процессы следует исследовать, используя динамические сети взаимодействующих молекул, и изменения в структуре или топологии сети определяют фенотип, служит основой для развивающейся новой области системной биологии [7].

В-четвертых, технические ограничения масс-спектрометрии (как основного «прорывного» метода протеомики) в полноте данных и воспроизводи-

¹ Химические модификации аминокислотных остатков после процесса трансляции.

² OMICs – собирательное название протеомики, транскриптомики, пептидомики, метаболомики и др. постгеномных дисциплин.

мости идентификации пептида и соответствия ему белка ограничивают потенциал результатов сравнения наборов протеомных данных, полученных различными исследователями и лабораториями. В итоге получается, что специализированные масс-спектрометрические группы генерируют крупные высококачественные наборы данных, которые трудно или просто невозможно интерпретировать и использовать в настоящее время, в то время как подавляющее большинство исследователей в области наук о жизни заняты анализом небольшого набора белков методами, разработанными десятилетия назад, примером которых служат вестерн-блот [18] и иммуноферментный анализ.

Следует отметить, что число белков человека, предсказанных по кодирующей геномной последовательности и выявленных экспериментально, хотя и возрастает, но не столь впечатляющими темпами, как ожидалось. Так, за 11 лет работ в проекте HLPP (Human Liver Protein Project) открыто 12168 белков ткани печени и органелл четырех основных типов клеток этой ткани, и в 2015 году ожидается приблизить это число к 13000 [19]. Всего в настоящее время в геноме человека найдено 20128 нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки; а экспериментально подтверждено наличие 15646 из них, что составляет 78%, если считать, что 1 ген = 1 белок [20, 21]. Так называемые «пропущенные белки», а также степень неопределенности, возникающая при отсутствии строгого соответствия числа генов количеству белков и другие уже известные молекулярно-биологические закономерности, осложняют изучение протеома человека.

Белки в организме не функционируют в одиночку, они формируют мультибелковые комплексы, с одной стороны, и сложные функциональные и динамичные сети, с другой [22–25]. Организация в функциональные модули отражает сложность и разнообразие протеома на субклеточном, клеточном и органном уровне. Понимание организации и функционирования белковых сетей, описывающих молекулярные механизмы биологических процессов, важно для выяснения регуляции (и поддержания) уровня здоровья и его резервов, а также развития заболеваний у человека (опухолевых, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и др.). Изучение взаимодействия белков, в том числе с небелковыми компонентами, и анализ белковых сетей, образованных белок-белковыми взаимодействиями, представляет собой важный инструмент для диагностики, выяснения патогенеза заболеваний, а также поиска молекулярных мишеней для терапевтических воздействий [26, 27]. Кроме того, поскольку большинство белков эукариот являются мультимодульными и полифункциональными

[28–30], белок приобретает способность выполнять целый комплекс различных функций при его участии в различных цепях. Вследствие этого обстоятельства белковые сети эукариот, как правило, переплетаются друг с другом [22, 31–33]. Задачи оценки взаимодействия молекулярных компонентов биологической системы и интеграции этой информации в системы сетей (network) или путей (pathway), которые можно использовать для создания моделей, предсказывающих поведение системы, представляют серьезный вызов для исследователей, развивающих биоинформационные методы анализа в протеомике [22, 25, 33–36].

ПРОТЕОМИКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

Протеомика и другие OMICs – геномика, транскриптомика, метаболомика – это не только и не столько новые инструменты исследования и новые возможности измерения. Их возникновение и развитие придало новый смысл и звучание системной биологии.

Edwards и Thiele [37] в своем обзоре пишут по поводу значения термина «системная биология»: «Если в этом нет ничего нового, то почему системная биология вдруг оказалась так на виду? Некоторые утверждают [38, 39], что неявно системная биология это миф, это – не более чем ребрендинг холистического типа мышления, свойственного отдельным биологам и специалистам интегративной физиологии в течение десятилетий». Как это часто случается с научными терминами, наполнение понятия «системная биология» в его нынешнем облике отличается от такового, использованного ранее в упомянутых науках. Таким образом, хотя сам термин «системная биология» и не нов, его смысл в настоящее время изменился. Это связано с развитием технологий, особенно секвенирования генома, вычислительной и аналитических платформ, таких, как масс-спектрометрия и ядерный магнитный резонанс. Для того чтобы по-настоящему изучать большие системы в их целостности, необходима возможность моделирования и измерения параметров этой системы в полном объеме. До секвенирования целых геномов это было непреодолимым экспериментальным вызовом для биологов. По мере увеличения вычислительных мощностей при обработке данных, развития геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики и флюксомики¹ становится возможным изучение «профиля» и модели биологической системы или подсистемы в ее полноте. Системная биология и так называемые дисциплины OMICs не тождественны. Системная биология, используя большую часть данных OMICs, вы-

¹ Методы математического описания или предсказания скоростей метаболических реакций в биологических системах; считается ключевой новой вычислительной технологией.

ходит за рамки этих методов [40–42]. В то же время большинством биологов, использующих геномику и OMICs, термин системная биология понимается несколько узко – как комплексный подход, использующий экспериментальные данные, полученные на разных уровнях организации живого. В наибольшей мере это обусловлено спецификой понимания термина, придающей ему общий смысл. Известный физиолог Noble с соавт. [43] в полном согласии с рядом других специалистов дает определение системной биологии как подходу, а не как области науки. В то же время ученые, работающие в области системной биологии, рассматривают ее как научную дисциплину, которая пытается изучать биологические системы в холистическом, а не редукционистском варианте. Это включает в себя сбор динамических глобальных коллекций данных вместе с фенотипическими данными с разных уровней иерархии биологической информации, чтобы выявить и объяснить механизмы возникающих свойств¹ системы [9, 25, 44].

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ

Нельзя не согласиться, что наиболее принципиальное отличие системной биологии от дисциплин OMICs и других родственных наук, таких, как интегративная физиология, – это центральная роль математического моделирования и компьютерных технологий [45–47]. Рассмотрение всех клеточных процессов в совокупности при одновременном изучении молекулярных механизмов того или иного процесса или явления в настоящее время невозможно даже с применением высокоэффективных экспериментальных методов. Инструменты для решения таких задач содержатся в арсенале системной биологии, поскольку она включает в себя методы математического и компьютерного моделирования [48]. Прежде всего – это метод молекулярной динамики [49], методы картирования интерактомо² (в том числе экспериментальные) [22], разработка специальных алгоритмов для конструирования, дизайна и визуализации внутри- и межклеточных процессов и явлений [51–53], используемых при компьютерном моделировании. Очевидно, что произошло существенное изменение в понимании термина «системная биология», и ряд авторов отмечают, что по этому вопросу все-таки формируется

консенсус [42, 45, 54]. Учитывая огромные объемы данных, порождаемых методами геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, их «ручная» интерпретация самим исследователем без помощи биоинформатики совершенно неэффективна, а чаще всего и невозможна, и применение методов и принципов системной биологии становится неизбежным.

Геномцентричная конструкция метаболических процессов организма человека с последующей реконструкцией, опубликованной в 2007 году, была названа Recon 1 [55]. Recon 1 описывал функции 1496 открытых рамок считывания для 2766 метаболитов и 3311 реакций, распределенных по семи клеточным компартментам (цитоплазма, митохондрии, ядро, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы) и во внеклеточной среде. Эта первая всеобъемлющая реконструкция метаболических путей, основанная на геноме человека, захватывает большинство известных центральных метаболических путей, имеющих в любой человеческой клетке [60]. Кроме того, реконструкция 2007 года послужила в качестве отправной точки для последующих реконструкций метаболизма конкретных тканей и типов клеток с использованием данных, генерируемых OMICs (например, транскриптомных и протеомных данных). Сейчас эти построения выполнены для макрофагов [61], гепатоцитов [62], миоцитов и адипоцитов [63] человека.

Основной вопрос, который решает системная биология в отношении физиологии человека, – это заполнение пробелов в молекулярных сетях вплоть до их полной реконструкции.

Одним из способов выявления недостающих реакций в реконструируемой сети является сравнение результатов модельных расчетов с экспериментальными данными [64]. Опубликованы многочисленные вычислительные алгоритмы [64–67], применяемые в этом методе. Кроме того, метаболомные данные клеток, тканей и биологических жидкостей [68–70] могут использоваться для выявления недостающих звеньев в обмене веществ человека. Есть несколько различных вычислительных подходов [65, 67], которые применяют в этих случаях для поиска отсутствующего в определенной реакции белка-кандидата и соответствующих генов [71, 72]. Эти вычислительные методы определяют одну или несколько реакций, присутствующих в организмах других видов, собранных в универсальной базе данных белковых взаимодействий, например, в базе лигандов KEGG [73], и добавляют их в метаболическую модель, восполняя таким образом потенциально недостающие знания. Если экспериментальное подтверждение не может быть найдено в научной литературе, то предсказывают отсутствующие

¹ Это свойства, возникающие в сложных системах в результате взаимодействия их компонентов, которые не могут быть предсказаны на основании свойств отдельных компонентов. При иерархической организации сложной системы свойства уровней влияют друг на друга как «снизу вверх», так и «сверху вниз» [13, 56–59].

² Интерактом, как полная сеть белок-белковых взаимодействий клетки или организма, значительно сложнее протеома и в последнее время используется как мера сложности организма [50].

гены и реакции, формулируют гипотезы, которые требуют экспериментальной проверки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Как эти методы помогают исследователю экстремальных состояний (и какая польза в получении данных этими методами о физиологии человека в экстремальных условиях среды для системной биологии)? Центральное место в практике системной биологии занимает концепция возмущающих воздействий [45]. Системная биология основана на: (1) возможности измерения всех переменных, представляющих интерес (OMICs); (2) наличии концептуальной основы для интерпретации данных (существуют модели); (3) применении способа возмущающих воздействий в эксперименте. Именно такие воздействия на организм, способные возмущать гомеостаз, позволяют распознать механизмы поддержания постоянства состава внутренней среды и сохранения резервов здоровья, адаптивный потенциал организма. Однако, если объект исследования – здоровый человек, то список методов (условий), этически дозволенных и доступных для воздействий, приводящих к отклонению его гомеостаза, будет относительно коротким и включает в себя физические нагрузки, использование фармакопрепаратов, манипуляции с питанием (например, использование липидных эмульсий [70] или директивные изменения в солепотреблении [74]), функциональные нагрузочные пробы [75], экологические исследования, включая воздействие экстремальных температур, гипербарии и гипоксии и, наконец, космический полет. Таким образом, экстремальные условия представляют собой один из немногих способов, позволяющих вызвать отклонение гомеостаза у здорового человека и предоставить «экспериментальные» данные для системной биологии. Поэтому мы считаем, что экологическая и гравитационная физиология и системная биология человека являются естественными симбионтами.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

Польза для системной биологии экспериментальных данных, получаемых при воздействии на организм человека физических упражнений, признается небольшим числом исследователей [76, 77]. В то же время применение методов системной биологии позволило показать весь комплекс белков и метаболитов, свойственных фазе напряжения (во время велопробега без остановки на 1060 км) [78], а также выявить механизм, лежащий в основе фенотипического ответа на физическую нагрузку (в процессе адаптации белых и красных миофибрилл рыб к тренировочным

нагрузкам), с активацией метаболических сетей в белых миофибриллах (катаболизм углеводов, синтез белка, сокращение мышц и детоксикация) и недостаточной экспрессией других в красных миофибриллах (осуществляющих производство энергии, сокращение мышц и поддержание гомеостаза) [79]. Использование аналитических возможностей различных OMICs предоставило данные, подтверждающие роль PGC-1 α как транскрипционного коактиватора, который координирует активизацию метаболических генов в мышцах человека (необходимых для митохондриального биогенеза) в ответ на физическую нагрузку [80]; позволило выявить связь геном-опосредованной пластичности мышц и управления митохондриогенезом со стороны ограничений на путях доставки кислорода [81]; а также определить метаболические пути, активируемые во время физической нагрузки с выявлением нескольких динамически регулируемых сетей с участием микроРНК-мРНК [82].

Начаты системно-биологические исследования экологической физиологии человека [42, 47]. Интересные работы выполнены в области «высотной» генетики и протеомики. Несколько исследований убедительно показали, что популяции человека, проживающие на большой высоте, подверглись генетической дивергенции. Так, тибетцы, чьи предки проживали на большой высоте более 10000 лет, имеют приобретенные и наследуемые новые мутации в гене, кодирующем кислород-чувствительный индуцируемый гипоксией фактор (HIF) [83, 84]. Исследования протеома биоптатов скелетных мышц, полученных от добровольцев, находившихся на высоте 4500 м в течение 1 недели [85], выполненные на основе двумерного гель-электрофореза, выявили значительно большее число белков (связанных с транспортом железа и окислительным метаболизмом), количество которых существенно отличалось от такового у опытных альпинистов после их пребывания на значительно большей высоте. Были изучены также изменения пептидома мочи [86] и протеома плазмы крови человека [87] в ответ на высотные экспозиции. В последнем случае особое внимание было уделено выявлению биомаркеров высотного отека легких. Эти и подобные исследования позволяют получить «строительные блоки» для согласованных усилий системной биологии и физиологии в понимании физиологической реакции человека на большой высоте. Обширные данные по экспериментальной гипоксии, в том числе с применением методов системной биологии, отражены в работах [88–95].

Восхождение человека к высочайшим горным вершинам инициировало всплеск исследований в области физиологических последствий физической ак-

тивности на высоте. Показано, что катаболические последствия для мышц хронической экспозиции в гипоксической среде обусловлены недостаточной активацией сигнальных путей, чувствительных к гипоксии, и подавлением энергоемких процессов трансляции белка [96]. Исследование модуляции протеома, вызванной гипобарической гипоксией, позволило установить, что эффективное использование путей генерации энергии в сопряжении с обилием антиоксидантных ферментов делает кору головного мозга менее уязвимой к гипоксии, чем гиппокамп [97]. Экспериментальное изучение легочной гипертензии в условиях гипобарической гипоксии показало характерное структурное ремоделирование легких, в механизме развития которого участвуют изоформы белка теплового шока (HSP70) и протеин-дисульфидизомеразы-A3 (PDIA3) [98].

Исследования механизмов окислительного стресса и, шире, окислительно-восстановительного гомеостаза клетки (redox homeostasis) убедительно подтвердили двойную роль активных форм кислорода (АФК) [99]. Их неконтролируемое перепроизводство вызывает повреждение клеточных структур, в том числе липидов мембран, белков и ДНК [100]. В то же время накапливается все больше фактов, свидетельствующих, что АФК в клетках выступают в качестве вторичных мессенджеров внутриклеточных сигнальных каскадов, которые могут вызывать и поддерживать онкогенный фенотип раковых клеток, но также способствуют клеточному старению и апоптозу [101]. Интенсивные работы в этой области даже привели к изменению определения термина «окислительный стресс», поставив этот процесс в зависимость от изменений в реальной посттрансляционной тиольной модификации белков [102, 103]. Повреждение АФК-индуцированных сигнальных путей имеет патофизиологические последствия в виде прогрессирования заболеваний (сердечно-сосудистых, атеросклероза, гипертензии, повреждения вследствие ишемии/реперфузии, сахарного диабета, нейродегенеративных заболеваний – болезней Альцгеймера и Паркинсона, ревматоидного артрита). Положительная роль АФК выражается в защите от инфекционных агентов путем неспецифической активации Т- и В-лимфоцитов, в участии в функционировании большого числа клеточных сигнальных путей, а также индукции митогенеза [100].

ГРАВИТАЦИОННАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

Наконец, космический полет, влияние условий которого уже полвека исследуется физиологами и медиками, можно рассматривать как небывалый в истории земной эволюции опыт адаптации здо-

рового человека к экстремальным условиям. Отдавая дань пионерам этих исследований в Советском Союзе (Л.А. Орбели, В.В. Парин, А.В. Лебединский, Н.М. Сисакян, О.Г. Газенко и многие, многие другие), в США, а также во Франции, Германии, Японии, – отсылаем читателя к фундаментальным монографиям, анализирующим многолетние результаты в этой области [104–107]. На физиологическом уровне многие эффекты, наблюдаемые у космонавтов после завершения космического полета, хорошо описаны. В целом это сложная картина адаптивных приспособительных реакций, затрагивающих все функциональные системы организма. Необходимость возвращения человека на Землю, в привычную среду, и обязательства медиков по сохранению его здоровья привели к попыткам, предпринимаемым специалистами всех без исключения космических агентств, разработать меры профилактики, замедляющие наступление фазы структурной адаптации к факторам, действующим на организм в космическом пространстве. Тем не менее в отдельных тканях обратная адаптация к жизни на Земле протекает чрезвычайно медленно (например, в костной ткани). Космическая физиология, очевидно, имеет дело с уникальным рисунком адаптации систем, тканей и клеток организма человека, показывающим ее возможности. Феноменология основных изменений, индуцированных условиями космического полета, включает: отрицательный баланс энергии (энергии больше тратится, чем потребляется), что имеет разнообразные последствия для многих процессов, протекающих в организме [107–110], а также воды и кальция [111, 112], но положительный баланс – натрия [113, 114], деминерализацию и модификацию структуры костной ткани [115], неэффективную терморегуляцию [116–118], изменения биоритмов продукции тепла, активности секреции гормонов, сердечной деятельности [118–121], реорганизацию управления сосудодвигательными реакциями [122] и дисфункцию эндотелия сосудов [123], гипотрофию мышц [124–126], снижение их тонуса и скоростно-силовых свойств, функциональную деафферентацию сенсорных систем, приводящую к нарушениям в контроле движений [127, 128], модификацию легочных объемов, биомеханики дыхания и его хеморецепторной регуляции [129, 130], космическую анемию [131]. Практически в каждой из областей остаются неизвестными молекулярные механизмы формирования этих новых состояний физиологических систем.

Адаптация организма человека к любым воздействиям внешней среды осуществляется с участием белков. На протяжении долгого времени в соответствии с аналитическими возможностями рабочие гипотезы формировались на основе предположений об изменении при адаптации концентраций рабо-

тающих белков или эффективности их работы (например, активности ферментов). В постгеномную эру становится понятным, что за этим уровнем изучения механизмов адаптации последуют и другие – исследование на уровне транскрипции, т.е. процесса формирования нового набора функционирующих белков; и изучение формирующихся при адаптации новых белковых комплексов и сетей белковых взаимодействий, новых каскадов реакций. Подобные исследования могут быть осуществлены системной биологией с использованием ее аналитических и биоинформационных подходов. Потребности, не реализованные до сих пор, а именно, выход на уровни OMICs, осознаются сообществом гравитационных физиологов. Glass [132], Jackman&Kandarian [133], Ventadour&Attaix [134], Blottner [135] отмечают, что биологические эффекты влияния микрогравитации на геном, протеом, транскриптом и метаболом практически полностью неизвестны.

Мы полагаем, что применение методов и подходов системной биологии к исследованию наиболее сложной (из возможных) на современном этапе молекулярной картины адаптивных механизмов не только принесет ценные фундаментальные знания, но также поможет заполнить «бреши» в картине метаболических путей человека; «бреши», о существовании многих из которых мы сейчас даже не подозреваем. Эта захватывающая перспектива только начинается осознаваться сообществом системных биологов. Появились первые работы по изучению изменений протеома биологических жидкостей (мочи и крови) космонавтов после полета [136, 137], которые, судя по активности посещения страниц открытого доступа (в PLoS One), вызвали большой интерес (700 считываний за неделю). Нами было исследовано влияние перегрузок на центрифуге большого радиуса [137], дыхания кислород-азот-аргоновой смесью в условиях гипербарии [138]. Изучались и особенности протеома мочи и крови при воздействии на организм здорового человека модельных условий «сухой иммерсии» [139] и продолжительной изоляции [140]. Поскольку вариабельность белковой композиции биологических жидкостей тела человека может маскировать эффекты предъявляемых воздействий, определили показатели индивидуальной и групповой вариабельности [141, 142]. Учет параметров групповой вариабельности и темпов проявления индивидуальной пластичности необходим, чтобы выделить функциональные сдвиги белковой композиции жидких сред организма в ходе изменений внешних условий жизнедеятельности, а также развития болезни. Методом прямого масс-спектрометрического профилирования сыворотки крови показано, какие белки определяют значительную групповую вариабельность ($CV = 42.6\%$),

а также зависимость этого параметра от возраста. Оказалось, что показатели индивидуальной вариабельности линейно зависят от длительности периода повторных обследований, возрастая с 16 до 42% на протяжении обследований от 1 сут до 1 года. Общими измерениями протеома крови, вызванными условиями как космического полета, так и модельных экспериментов, оказались модификации пиков белков «острой фазы» ($\beta 2$ -микроглобулин, цистатин С) и липидного обмена (аполипопротеины CI, CIII, AII), а также сдвиги активности протеолитических систем крови, что может приводить к изменению паттерна фрагментов белков.

Высокая групповая и индивидуальная вариабельность белкового профиля мочи отмечена многими учеными. Нами показано, что она сохраняется даже в строгих условиях модельных экспериментов (при контроле уровней потребления основных нутриентов, жидкости, уровня двигательной активности, состава атмосферы, ритма сна-бодрствования). При наблюдении за модификацией протеома мочи здоровых молодых мужчин в течение 520 сут эксперимента с изоляцией в гермообъекте нам удалось выявить и охарактеризовать как наиболее пластичную часть низкомолекулярного субпротеома мочи, так и его постоянную составляющую. Кроме того, выявлены белки, частота появления которых в моче зависела от уровня потребления добровольцами соли.

Изучение протеома мочи космонавтов позволило выявить стабильную часть субпротеома, представленную 21 белком с различной тканевой специфичностью и субклеточной локализацией. В том числе после длительных полетов на МКС в моче космонавтов появляются три белка (афамин, аминокептидаза А и аквапорин-2), частота обнаружения которых в образцах с наибольшей вероятностью связана с воздействием факторов космического полета. Перегрузки, воздействующие на организм космонавтов в начальном и завершающем этапе полета, также могут влиять на белковую композицию внеклеточной жидкости.

В модели «сухой иммерсии» при развитии полиурии по механизму, близкому к салурезу, выявляется физиологическая протеинурия, конкурентно-зависимая от реабсорбции натрия в проксимальном канальце нефрона.

Очевидно, что белки, изменение уровня которых наблюдается в экстремальных условиях, не могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры развития заболеваний, поскольку они участвуют как в естественном молекулярном ответе организма в процессе адаптации к изменению условий жизнедеятельности, так и в неспецифическом компоненте патогенеза заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сотрудничество физиологов и специалистов в области системной биологии при изучении адаптации здорового человека к экстремальным условиям окружающей среды становится все более тесным и взаимовыгодным. Отмечают, что применение методов системной биологии в области физиологической адаптации к экстремальным средам помогает отойти от редуционистских подходов и избежать парадоксов (примером может служить так называемый «лактатный парадокс при гипоксии»¹) в интерпретации данных [76, 143].

Сейчас в мире растет интерес, доведенный в некоторой степени до повестки дня крупных организаций, финансирующих науку, к построению сотрудничества между исследователями в области наук о жизни и их коллегами – физиками, программистами, химиками и математиками. Таким образом,

¹ Этим термином обозначают феномен, связанный с угнетением процессов гликолиза при акклиматизации к хронической гипоксии. Показано, что острый период адаптации к большой высоте сопровождается более высоким уровнем лактата в крови в любой момент субмаксимальной нагрузки, чем при нагрузке в нормоксии, хотя пик уровня лактата остается неизменным. Однако у лиц, которые акклиматизировались к высоте в течение более 3 недель, нагрузка той же абсолютной величины и максимальная нагрузка дают меньший прирост уровня лактата в крови по сравнению с той же физической нагрузкой у лиц в неакклиматизированном состоянии. Это явление, изначально рассматриваемое как парадокс (т.е. не соответствующее логическому ходу вещей), предполагало, что производство АТФ в хронической гипоксии, по-видимому, не зависит от увеличения анаэробного гликолиза, но что производство митохондриальной АТФ становится «лучше настроенным» на гипоксическое состояние организма. Недавние исследования, однако, показали, что «лактатный парадокс» может быть только переходной особенностью гипоксической адаптации к высоте, исчезая более чем через 6 недель, при спуске на равнину после нахождения на высотах свыше 5000 м. Кроме того, снижение способности мышц к продукции лактата в период, следующий за акклиматизацией, не было показано во всех работах на эту тему. Остается открытым вопрос – возникает ли «лактатный парадокс» от снижения мышечного производства лактата из-за изменения субстратных предпочтений или изменения «обработке» лактата через ферментные комплексы митохондрий МСТ1 и МСТ4 (транспортёры монокарбонных соединений 1 и 4) в мышце, или лучшего сопряжения синтеза пирувата с процессом окисления в митохондриях? Это еще предстоит решить, вместе с определением четкого профиля условий, при которых это происходит. Некоторыми авторами высказывается предположение, что явление, аналогичное так называемому «лактатному парадоксу», может возникать и в тканях, отличных от мышц, в ответ на острый метаболический стресс в условиях хронической гипоксии.

сотрудничество работающих в областях системной биологии/биоинженерии и физиологии человека будет становиться все более распространенным. Новое поколение ученых, которое придет работать в эту область, будет более трансдисциплинарным. Мы согласны с утверждением Edwards [37], что «биология не может больше считаться областью деятельности тех, кто в свое время не смог сдать математику». Следовательно, физиологи и ученые, работающие в области наук о жизни, должны быть готовы к современному вызову путем расширения познаний в вычислительных методах и математики вообще до уровня, который позволит им быть продуктивными системными биологами и взаимодействовать с учеными из других областей. Встречное движение ученых-физиков и математиков – более трудный процесс. Мы не одиноки в этой точке зрения. Перефразируя Ideker и соавт. [45], можно сказать, что «польза кросс-дисциплинарных ученых будет пропорциональна их пониманию биологии».

Таким образом, новые подходы, присущие современной системной биологии, могут быть использованы для более глубокого понимания физиологической адаптации здорового человека в экстремальных условиях. Можно, безусловно, согласиться с мнением, что экологическая физиология и системная биология являются естественными партнерами [144]. Исследования адаптации организма человека к различным факторам внешней среды, а также изучение его реакции на космический полет предоставляют уникальную платформу для изучения физиологии человека с системной точки зрения, позволяя ученым организовать вызов гомеостазу как этичным, так и эволюционно-обоснованным образом. В конечном счете, есть надежда, что отношения между интегративной физиологией и системной биологией будут развиваться, а взаимопонимание – углубляться, что приведет нас к более зрелому и глубокому пониманию биологии здорового человека. ●

*Работа частично поддержана грантом
Президента РФ «Ведущие научные школы»
(НШ-1207.2012.4), РФФИ (грант № 13-04-01894).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- James P. // Quarterly Rev. Biophys. 1997. V. 30 № 4. P. 279–331. doi:10.1017/S0033583597003399. PMID 9634650.
- Murray R.F., Harper H.W., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Harper's Illustrated Biochemistry. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2006.
- Hey J., Posch A., Cohen A. // Meth. Mol. Biol. 2008. № 424. P. 225–239. doi:10.1007/978-1-60327-064-9_19. PMID 18369866.
- O'Farrell P.H. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 10. P. 4007–4021.
- Karas M., Bachmann D., Bahr D., Hillenkamp F. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987. № 78. P. 53–68.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. // Science. 1989. V. 246. P. 64–71.
- Bensimon A., Heck A.J.R., Aebersold R. // Annu. Rev. Biochem. 2012. V. 81. № 1. P. 379–405.
- Alberts B. // Science. 2012. V. 337. № 6102. P. 1583.
- Bard J. // Cell. 2013. V. 2. P. 414–431.
- Lander E.S. // Nature. 2011. V. 470. № 7333. P. 187–197.
- Sverdlov E.D. // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2010. № 3. P. 3–23.
- Sverdlov E.D. // Biochemistry (Mosc.). 2009. V. 74. P. 939–944.
- Noble D. // Intersace Focus. 2012. V. 2. № 1. P. 55064.

14. Nagaraj N., Wisniewski J.R., Geiger T., Cox J., Kircher M., Kelso J., Pääbo S., Mann M. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. № 7. P. 548.
15. Beck M., Schmidt A., Malmstroem J., Claassen M., Ori A., Szymborska A., Herzog F., Rinner O., Ellenberg J., Aebersold R. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. № 7. P. 549.
16. Munoz J., Low T.Y., Kok Y.J., Chin A., Frese C.K., Ding V., Choo A., Heck A.J. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. № 7. P. 550.
17. Vidal M., Chan D.W., Gerstein M., Mann M., Omenn G.S., Tagle D., Sechi S. // *Clin. Proteomics.* 2012. V. 9. № 1. P. 6.
18. Burnette W.N. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 112. № 2. P. 195–203.
19. Zhang Y., Yang C., Wang S., Chen T., Li M., Wang X., Li D., Wang K., Ma J., Wu S., et al. // *Liver Int.* 2013. V. 33. № 8. P. 1239–1248. doi: 10.1111/liv.12173.
20. Legrain P. // Annual International Congress HUPO-2013, Yokohama, Japan. 12–18 September 2013. Book of Program & Keynote Lectures, 2013.
21. Radivojac P., Clark W.T., Oron T.R., Schnoes A.M., Wittkop T., Sokolov A., Graim K., Funk C., Verspoor K., Ben-Hur A., et al. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 3. P. 221–227.
22. Терентьева А.А., Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В. // *Успехи биол. химии.* 2009. Т. 49. С. 427–480.
23. Bose B. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2013. V. 113. № 3. P. 358–368.
24. Kitano H. // *Science.* 2002. V. 295. № 5560. P. 1662–1664.
25. Naylor S., Chen J.Y. // *Per. Med.* 2010. V. 7. № 3. P. 275–289.
26. Brenner S. // *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2010. V. 365. № 1537. P. 201–212.
27. Brenner S., Sijnowski T.J. // *Science.* 2011. V. 334. № 6056. P. 567.
28. Carbo A., Hontecillas R., Kronsteiner B., Viladomiu M., Pedragosa M., Lu P., Philipson C.W., Hoops S., Marathe M., Eubank S., et al. // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. № 4. e1003027.
29. Chauhan C., Joseph J. // *Int. J. Health Serv.* 2013. V. 43. № 2. P. 281–303.
30. Cesareni G., Gimona M., Sudol M., Yaffe M. *Modular protein domains.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2004.
31. Tong A.H., Drees B., Nardelli G., Bader G.D., Branetti B., Castagnoli L., Evangelista M., Ferracuti S., Nelson B., Paoluzi S., et al. // *Science.* 2002. V. 295. № 5553. P. 21–24.
32. Sommer B., Kormeyer B., Demenkov P.S., Arrigo P., Hippe K., Ates Ö., Kochetov A.V., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A., Hofestädt R. // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2013. V. 11. № 1. P. 1340005.
33. Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. // *In Silico Biol.* 2011–2012. V. 11. № 3–4. P. 149–161.
34. Hood L., Heath J.R., Phelps M.E., Lin B. // *Science.* 2004. V. 306. № 5696. P. 640–643.
35. Park S., Yang J.S., Jang S.K., Kim S. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 7. P. 3367–3376.
36. Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Pintus S.S., Ivanisenko T.V., Podkolodny N.L., Ivanisenko L.N., Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Kostrjukova E.S., Levizkiy S.A., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2012. V. 443. P. 76–80.
37. Edwards L.M., Thiele I. // *Extreme Physiol. Med.* 2013. № 2. P. 1–8.
38. Hargreaves M. // *J. Appl. Physiol.* 2008. № 104. P. 1541–1542.
39. Greenhaff P.L., Hargreaves M. // *J. Physiol.* 2011. № 589. P. 1031–1036.
40. Carlson R.P., Oshota O.J., Taffs R.L. // *Subcell. Biochem.* 2012. № 64. P. 139–157.
41. Thiele I., Palsson B.O. // *Nat. Protoc.* 2010. № 5. P. 93–121.
42. Palsson B. *Systems Biology.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008.
43. Kohl P., Crampin E.J., Quinn T.F., Noble D. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010. V. 88. № 1. P. 25–33.
44. Hood L., Rowen L., Galas D.J., Aitchison J.D. // *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 2008. V. 7. № 4. P. 239–248.
45. Ideker T., Galitski T., Hood L. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. № 2. P. 343–372.
46. Westerhoff H.V. // *Meth. Enzymol.* 2011. № 500. P. 3–11.
47. Shublaq N., Sansom C., Coveney P.V. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2013. V. 81. № 1. P. 5–12. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01444.x.
48. You L. // *Cell Biochem. Biophys.* 2004. V. 40. P. 167–184.
49. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.В., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Ли А., Кирпичников М.И. // *Рос. хим. журн.* 2006. Т. 50. С. 53–65.
50. Stumpf M.P., Thorne T., de Silva E., Stewart R., An H.J., Lappe M., Wiuf C. // *PNAS.* 2008. V. 105. P. 6959–6964.
51. Visvanathan M., Breit M., Pfeifer B., Baumgartner C., Modre-Osprian R., Tilg B. // *Meth. Inf. Med.* 2007. V. 46. P. 381–391.
52. Suresh Babu C.V., Joo Song E., Yoo Y.S. // *Biochimie.* 2006. V. 88. № 3–4. P. 277–283.
53. Conzelmann H., Saez-Rodriguez J., Sauter T., Bullinger E., Allgöwer F., Gilles E.D. // *Syst. Biol. (Stevenage).* 2004. V. 1. № 1. P. 159–169.
54. Wanjek C. // *The NIH Catalyst.* 2011. № 19. P. 1.
55. Duarte N.C., Becker S.A., Jamshidi N., Thiele I., Mo M.L., Vo T.D., Srivas R., Palsson B.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. № 104. P. 1777–1782.
56. Korn R. // *Biology and Philosophy.* 2005. V. 20. № 1. P. 137–151.
57. Noble D. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2013. V. 111. № 2–3. P. 59–65.
58. Noble D. // *Philos Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2008. V. 366. № 1878. P. 3001–3015.
59. van Regenmortel M.H. // *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 11. P. 1016–1020.
60. Bordbar A., Palsson B.O. // *J. Intern. Med.* 2012. № 271. P. 131–141.
61. Bordbar A., Lewis N.E., Schellenberger J., Palsson B.O., Jamshidi N. // *Mol. Syst. Biol.* 2010. № 6. P. 422.
62. Gille C., Bolling C., Hoppe A., Bulik S., Hoffmann S., Hübner K., Karlstädt A., Ganeshan R., König M., Rother K., et al. // *Mol. Syst. Biol.* 2010. № 6. P. 411.
63. Bordbar A., Feist A.M., Usaite-Black R., Woodcock J., Palsson B.O., Famili I. // *BMC Syst. Biol.* 2011. № 5. P. 180.
64. Qu Z., Garfinkel A., Weiss J., Nivala M. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2011. № 107. P. 21–31.
65. Reed J.L., Patel T.R., Chen K.H., Joyce A.R., Applebee M.K., Herring C.D., Bui O.T., Knight E.M., Fong S.S., Palsson B.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. № 103. P. 17480–17484.
66. Satish Kumar V., Dasika M.S., Maranas S.D. // *BMC Bioinform.* 2007. № 8. P. 212.
67. Kumar V.S., Maranas C.D. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. № 5. e1000308.
68. Illig T., Gieger C., Zhai G., Römisch-Margl W., Wang-Sattler R., Prehn C., Altmaier E., Kastenmüller G., Kato B.S., Mewes H.W., et al. // *Nat. Genet.* 2010. № 42. P. 137–141.
69. Suhre K., Wallaschofski H., Raffler J., Friedrich N., Haring R., Michael K., Wasner C., Krebs A., Kronenberg F., Chang D., et al. // *Nat. Genet.* 2011. № 43. P. 565–569.
70. Edwards L.M., Lawler N.G., Nikolic S.B., Peters J.M., Horne J., Wilson R., Davies N.W., Sharman J.E. // *J. Lipid Res.* 2012. V. 53. № 9. P. 1979–1986.
71. Orth J.D., Palsson B.O. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. № 107. P. 403–412.
72. Rolfsson O., Palsson B.O., Thiele I. // *BMC Syst. Biol.* 2011. № 5. P. 155.
73. Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M. // *Nucl. Acids Res.* 2006. № 34. P. 354–357.

74. Jens T., Maillot A., Lang R., Gunga H.C., Johannes B., Gauquelin-Koch G., Kihm E., Larina I., Gharib C., Kirsch K.A. // *Am. J. Kidney Dis.* 2002. V. 40. № 3. P. 508–516.
75. Григорьев А.И., Арзамазов Г.С., Дорохова Б.Р., Козыревская Г.И., Моруков Б.В., Наточин Ю.В., Носков В.Б., Хмельков В.П. Методические рекомендации по использованию водной и водно-солевых нагрузочных проб при оценке функционального состояния почек человека. М.: Мин. здрав. СССР. 1979. 31 с.
76. Vazquez A., Oltvai Z.N. // *PLoS One.* 2011. № 6. e19538.
77. van Beek J.H., Supandi F., Gavai A.K., de Graaf A.A., Binsl T.W., Hettling H. // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2011. № 369. P. 4295–4315.
78. Zauber H., Mosler S., von Heßberg A., Schulze W.X. // *Proteomics.* 2012. V. 12. № 13. P. 2221–2235. doi: 10.1002/pmic.201100228.
79. Martin-Perez M., Fernandez-Borras J., Ibarz A., Millan-Cubillo A., Felip O., de Oliveira E., Blasco J. // *J. Proteome Res.* 2012. V. 6. № 11(7). P. 3533–547. doi: 10.1021/pr3002832.
80. Pilegaard H., Saltin B., Neuffer P.D. // *J. Physiol.* 2003. V. 546 (Pt 3). P. 851–858.
81. Flueck M. // *Exp. Physiol.* 2010. V. 95. № 3. P. 451–462. doi: 10.1113/expphysiol.2009.047605.
82. Tonevitsky A.G., Maltseva D.V., Abbasi A., Samatov T.R., Sakharov D.A., Shkurnikov M.U., Lebedev A.E., Galatenko V.V., Grigoriev A.I., Northoff H. // *BMC Physiol.* 2013. V. 13. P. 9. doi: 10.1186/1472-6793-13-9.
83. Beall C.M., Cavalleri G., Deng L., Elston R.C., Gao Y., Knight J., Li C., Li J.C., Liang Y., McCormack M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. № 107. P. 11459–11464.
84. Yi X., Liang Y., Huerta-Sanchez E., Jin X., Cuo Z.X., Pool J.E., Xu X., Jiang H., Vinckenbosch N., Korneliussen T.S., et al. // *Science.* 2010. № 329. P. 75–78.
85. Viganò A., Ripamonti M., De Palma S., Capitanio D., Vasso M., Wait R., Lundby C., Cerretelli P., Gelfi C. // *Proteomics.* 2008. № 8. P. 4668–4679.
86. Mainini V., Gianazza E., Chinello C., Bilo G., Revera M., Giuliano A., Caldara G., Lombardi C., Piperno A., Magni F. // *Mol. Biosyst.* 2012. № 8. P. 959–966.
87. Ahmad Y., Shukla D., Garg I., Sharma N.K., Saxena S., Malhotra V.K., Bhargava K. // *Funct. Integr. Genomics.* 2011. № 11. P. 407–417.
88. Lai X., Nikolov S., Wolkenhauer O., Vera J. // *Comput. Biol. Chem.* 2009. № 3. P. 312–324.
89. Turan N., Kalko S., Stincone A., Clarke K., Sabah A., Howlett K., Curnow S.J., Rodriguez D.A., Cascante M., O'Neill L., et al. // *PLoS Comput. Biol.* 2011. № 7. e1002129.
90. Stefanini M.O., Qutub A.A., Mac Gabhann F., Popel A.S. // *Math. Med. Biol.* 2012. № 29. P. 85–94.
91. Baumann K., Carnicer M., Dragosits M., Graf A.B., Stadtmann J., Jouhten P., Maaheimo H., Gasser B., Albiol J., Matanovich D., et al. // *BMC Syst. Biol.* 2010. № 4. P. 141.
92. Schmierer B., Novak B., Schofield C.J. // *BMC Syst. Biol.* 2010. № 4. P. 139.
93. Mac Gabhann F., Qutub A.A., Annex B.H., Popel A.S. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010. № 2. P. 694–707.
94. Kojima T., Ueda Y., Adati N., Kitamoto A., Sato A., Huang M.C., Noor J., Sameshima H., Ikenoue T. // *J. Mol. Neurosci.* 2010. № 42. P. 154–161.
95. Selivanov V.A., Votyakova T.V., Zeak J.A., Trucco M., Roca J., Cascante M. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. № 5. e1000619.
96. Flueck M. // *High Alt. Med. Biol.* 2009. V. 10. № 2. P. 183–193. doi: 10.1089/ham.2008.1104.
97. Sharma N.K., Sethy N.K., Bhargava K. // *J. Proteomics.* 2013. V. 21. № 79. P. 277–298. doi: 10.1016/j.jprot.2012.12.020.
98. Ohata Y., Ogata S., Nakanishi K., Kanazawa F., Uenoyama M., Hiroi S., Tominaga S., Toda T., Kawai T. // *Histol. Histopathol.* 2013. V. 28. № 7. P. 893–902.
99. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telsler J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. V. 39. № 1. P. 44–84.
100. Blokhina O., Fagerstedt K.V. // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. № 5. P. 359–373. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.01.007.
101. Jones D.P. // *Rejuvenation Res.* 2006. V. 9. № 2. P. 169–181.
102. Harris C., Shuster D.Z., Roman Gomez R., Sant K.E., Reed M.S., Pohl J., Hansen J.M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. № 63. P. 325–337. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.040.
103. Harris C., Hansen J.M. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 889. P. 325–346. doi: 10.1007/978-1-61779-867-2_21.
104. Орбитальная станция «Мир» / Под ред. Григорьева А.И. М.: ООО «Аником», 2002. Т. 1. С. 660.
105. Орбитальная станция «Мир» / Под ред. Григорьева А.И. М.: ООО «Аником», 2002. Т. 2. С. 623.
106. Международная космическая станция / Под ред. Григорьева А.И. М.: ИМБП РАН, 2011.
107. Leach-Huntton C.S., Grigoriev A.I., Natchin V.Yu. Am. Astronautical Soc. Publ. San Diego, California, USA. 1998. V. 94. 220 p.
108. Stein T.P. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013. V. 113. № 9. P. 2171–2181. doi: 10.1007/s00421-012-2548-9.
109. Ларина И.М., Стейн Т.Р., Лескин М.Дж., Шлутер М.Д. // Орбитальная станция «Мир» / Под ред. Григорьева А.И. М.: ООО «Аником», 2002. Т. 2. С. 114–121.
110. Ajotto G.V., Himomura Y.S. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2006. V. 52. P. 233–247.
111. Газенко О.Г., Григорьев А.И., Наточин Ю.В. Водно-солевой гомеостаз и космический полет. М.: Наука, 1986. С. 256.
112. Morukov B.V., Noskov V.B., Larina I.M., Natchin Iu.V. // *Ros. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 2003. V. 89. № 3. P. 356–367.
113. Gerzer R., Heer M. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005. V. 6. № 4. P. 299–304.
114. Drummer C., Norsk P., Heer M. // *Am. J. Kidney Dis.* 2001. V. 38. № 3. P. 684–690.
115. Oganov V.S., Bogomolov V.V., Bakulin A.V., Novikov V.E., Kabitskaia O.E., Murashko L.M., Morgun V.V., Kasparskii R.R. // *Fiziol. Cheloveka.* 2010. V. 36. № 3. P. 39–47.
116. Klimovitsky V.Y., Alpatov A.M., Hoban-Higgins T.M., Utekhina E.S., Fuller C.A. // *J. Gravit. Physiol.* 2000. V. 7. P. 149.
117. Lakota N.G., Larina I.M. // *Human Physiol.* 2002. V. 28. № 3. P. 82–92.
118. Robinson E.L., Fuller C.A. // *Pflügers Arch.* 2000. V. 441 (2–3 Suppl). P. R32–38.
119. Fuller P.M., Jones T.A., Jones S.M., Fuller C.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 26. № 99(24). P. 15723–15728.
120. Ларина И.М., Уитсон П., Смирнова Т.М., Чен Ю.-М. // Физиология человека. 2000. Т. 26. № 4. С. 94–100.
121. Баевский Р.М. // Физиология человека. 2002. Т. 28. № 2. С. 70–82.
122. Fomina G.A., Kotovskaya A.R., Pochuev V.I., Zhernavkov A.F. // *Human Physiol.* 2008. V. 34. № 3. P. 92–97.
123. Navasilava N.M., Dignat-George F., Sabatier F., Larina I.M., Demiot C., Fortrat J.-O., Gauquelin-Koch G., Kozlovskaya I.B., Custaud M.-A. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010. V. 299. № 2. P. H248–256. doi: 10.1152/ajpheart.00152.2010.
124. Ohira Y., Yoshinaga T., Nomura T., Kawano F., Ishihara A., Nonaka I., Roy R.R., Edgerton V.R. // *Adv. Space Res.* 2002. V. 30. № 4. P. 777–781.
125. Edgerton V.R., Zhou M.Y., Ohira Y., Klitgaard H., Jiang B., Bell G., Harris B., Saltin B., Gollnick P.D., Roy R.R. // *J. Appl. Physiol.* 1995. V. 78. № 5. P. 1733–1739.

126. Шенкман Б.С., Немировская Т.Л., Белозерова И.Н., Челлова И.А., Козловская И.Б. // Докл. АН. 1999. Т. 367. № 2. С. 279–281.
127. Tomilovskaya E.S., Berger M., Gerstenbrand F., Kozlovskaya I.B. // *J. Gravit. Physiol.* 2007. V. 14. № 1. P. 79–80.
128. Kornilova L.N., Naumov I.A., Azarov K.A., Sagalovitch V.N. // *Aviat Space Environ. Med.* 2012. V. 83. № 12. P. 1123–1134.
129. Baevsky R.M., Baranov V.M., Funtova I.I., Diedrich A., Pashenko A.V., Chernikova A.G., Drescher J., Jordan J., Tank J. // *J. Appl. Physiol.* 2007. V. 103. № 1. P. 156–161.
130. Баранов В.М., Попова Ю.А., Суворов А.В. Космическая биология и медицина. Т. 2. Медико-биологические исследования на российском сегменте МКС. М., 2011. С. 72–92.
131. Grigor'ev A.I., Ivanova S.M., Morukov B.V., Maksimov G.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008. V. 422. P. 308–311.
132. Glass D.J. // *Trends Mol. Med.* 2003. V. 9. № 8. P. 344–350.
133. Jackman R.W., Kandarian S.C. // *Am. Physiol. Cell Physiol.* 2004. V. 287. № 4. P. 834–843.
134. Ventadour S., Attaix D. // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2006. V. 18. № 6. P. 631–635.
135. Blottner D., Serradj N., Salanova M., Touma C., Palme R., Silva M., Aerts J.M., Berckmans D., Vico L., Liu Y., et al. // *J. Comp. Physiol. B.* 2009. V. 179. № 4. P. 519–533. doi: 10.1007/s00360-008-0330-4.
136. Pastushkova L.Kh., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Popov I.A., Starodubtseva N.L., Dobrokhотов I.V., Ivanisenko V.A., Larina I.M., Kolchanov N.A., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 8. e71652.
137. Киреев К.С. Белки почек и мочевыводящей системы в протеоме мочи здорового человека после длительного космического полета: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: ГНЦ РФ – ИМБП РАН, 2013. С. 25.
138. Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Попова Ю.А., Ларина И.М. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2010. Т. 148. № 2. С. 42–45.
139. Пастушкова Л.Х., Доброхотов И.В., Веселова О.М., Тийс Е.С., Кононихин А.С., Новоселова А.М., Купе М., Кусто М.-А., Ларина И.М. // *Физиология человека.* 2014. Т. 40. № 3. С. 109–119.
140. Ларина И.М., Колчанов Н.А., Доброхотов И.В., Иванисенко В.А., Деменков П.С., Тийс Е.С., Валеева О.А., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н. // *Физиология человека.* 2012. Т. 38. № 3. С. 107–115.
141. Trifonova O., Larina I., Grigoriev A., Lisitsa A., Moshkovskii S., Archakov A. // *Expert Rev. Proteomics.* 2010. V. 7. № 3. P. 431–438.
142. Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Мошковский С.А., Ларина И.М. // *Биомедицина.* 2011. Т. 5. № 3. С. 203–212.
143. Murray A.J. // *Genome Med.* 2009. № 1. P. 117.
144. Hood L.E., Omenn G.S., Moritz R.L., Aebersold R., Yamamoto K.R., Amos M., Hunter-Cevera J., Locascio L. // *Proteomics.* 2012. V. 12. № 18. P. 2773–2783.

УДК 577.1;577.15

Исследование взаимосвязи структура–функция–стабильность в дрожжевой оксидазе *D*-аминокислот: гидрофобизация альфа-спиралей

И. В. Голубев^{1,2}, Н. В. Комарова^{2,3}, К. В. Рыженкова^{1,2}, Т. А. Чубарь^{1,2}, С. С. Савин^{2,3},
В. И. Тишков^{1,2,3*}

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

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

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2014

РЕФЕРАТ Гидрофобизация α -спиралей является одним из общих подходов повышения температурной стабильности ферментов. На основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей оксидаз *D*-аминокислот из различных источников и анализа трехмерной структуры оксидазы *D*-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO, [КФ 1.4.3.3]) найдены 11 остатков Ser, расположенных в α -спиралях. По результатам дальнейшего структурного анализа восемь из них отобрали (в положениях 67, 77, 78, 105, 270, 277, 335 и 336) для замены на остатки Ala. Замены Ser78Ala и Ser270Ala привели к сильной дестабилизации фермента – мутантные варианты инактивировались в процессе их выделения из клеток. Остальные шесть мутантных TvDAAO были получены в высокоочищенном состоянии и изучены их свойства. Замены Ser277Ala и Ser336Ala привели к дестабилизации белковой глобулы, мутанты TvDAAO Ser77Ala и TvDAAO Ser335Ala по термостабильности были близки к ферменту дикого типа, в то время как замены Ser67Ala и Ser105Ala повысили температурную стабильность приблизительно в 1.5 и 2 раза. Кроме того, каталитическая эффективность мутантной TvDAAO Ser105Ala с *D*-Asn, *D*-Tyr, *D*-Phe и *D*-Leu была в среднем в 1.2–3 раза выше, чем у фермента дикого типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белковая инженерия, гидрофобизация α -спирали, направленный мутагенез, оксидаза *D*-аминокислот из *Trigonopsis variabilis*, субстратная специфичность, температурная стабильность.

ВВЕДЕНИЕ

Оксидаза *D*-аминокислот (DAAO, [КФ 1.4.3.3]) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует окислительное дезаминирование *D*-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты [1]. DAAO широко распространена в природе, гены этого фермента найдены в клетках моллюсков, рыб, рептилий, амфибий, насекомых, птиц, растений, млекопитающих, а также в микроорганизмах – микроскопических грибах, дрожжах и бактериях, где она выполняет важные физиологические функции [2, 3]. Разработаны процессы синтеза оптически активных соединений, α -кетокислот, 7-аминоцефалоспоровой кислоты с участием DAAO, этот фермент используют также в биосенсорах для определения содержания *D*-аминокислот [2, 4, 5]. Наиболее широкое применение нашли два фермента – из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) и *Trigonop-*

sis variabilis (TvDAAO). Среди известных оксидаз *D*-аминокислот TvDAAO обладает наиболее высокой активностью с цефалоспорином С (CephC) [6] и наилучшей температурной стабильностью [7]. Например, при инкубации в течение 30 мин при 45°C TvDAAO сохраняет 100% активности, в то время как RgDAAO в этих условиях инактивируется полностью. DAAO из *Arthrobacter protophormiae* и *Candida boidinii*, температурная стабильность которых также изучена, очень схожи с RgDAAO – при 50°C они полностью теряют активность за 30 мин [5, 8, 9].

В нашей лаборатории был клонирован ген оксидазы *D*-аминокислот из дрожжей *T. variabilis*, разработана система сверхэкспрессии рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме, изучены его свойства [10]. В нативном состоянии TvDAAO представляет собой гомодимер [11], который имеет ось симметрии второго

порядка такую, что субъединицы расположены друг относительно друга по типу «голова-хвост». Каждая субъединица содержит одну молекулу кофактора FAD в активном центре.

Повышение термостабильности практически важных ферментов является одновременно и фундаментальной, и прикладной задачей. Получаемые в ходе таких экспериментов данные позволяют более полно и глубоко понять взаимосвязи между структурой, функцией и стабильностью исследуемого белка. В то же время решение данной задачи позволяет снизить потери фермента в ходе выделения и упрощает процесс очистки, что, в свою очередь, приводит к снижению стоимости конечного продукта. Например, ранее в нашей лаборатории были получены мутантные формиадегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 с увеличенной температурной стабильностью, что позволило ввести в процесс очистки рекомбинантного фермента стадию термообработки. Нагревание бесклеточного экстракта при 60°C в течение 20–30 мин приводило к повышению чистоты препарата с 50 до 80–85% без потери ферментативной активности [12].

К настоящему времени опубликовано весьма ограниченное количество данных по увеличению температурной стабильности TvDAAO с помощью белковой инженерии. Всего в двух работах получены мутантные формы TvDAAO с точечными аминокислотными заменами, у которых наблюдалось незначительное увеличение температурной стабильности по сравнению с ферментом дикого типа [13, 14]. Сообщалось также о ковалентном сшивании двух субъединиц TvDAAO дипептидом Lys-Leu [15], в результате чего T_m увеличилась на 2°C, но при этом ухудшились каталитические свойства с большинством субстратов.

В данной работе представлены результаты применения к оксидазе D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* общего подхода повышения температурной стабильности, основанного на гидрофобизации. Гидрофобизация была выполнена за счет замены остатков серина на остатки аланина в α -спиральных участках структуры TvDAAO. Изучено также влияние этих замен на каталитические свойства фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки Molecular Biology Grade. В микробиологических экспериментах применяли бакто-триптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США), глицерин (99.9%) и хлорид кальция («ultra pure»), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия («pure for analysis»), лизоцим (Fluka/BioChemika, Швейцария), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ),

2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (ABTS), канамицин и хлорамфеникол (Sigma, США), глюкозу и хлорид натрия («ч.д.а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и Pfu-ДНК-полимеразу (Thermo Scientific) использовали для клонирования фрагментов ДНК и направленного мутагенеза. Для выделения ДНК из агарозного геля и плазмид из клеток *E. coli* использовали наборы реагентов фирмы Thermo Scientific. Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). В этих экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

В работе использовали следующие штаммы бактерий *E. coli*:

E. coli DH5 α : *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

E. coli BL21(DE3) pLysS Codon Plus: В F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW Cam*^r].

Все реактивы для электрофореза белков произведены фирмой Bio-Rad (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли Трис (трис(гидроксиметил)аминометан, «ч.д.а.») фирмы Merck (Германия), рацематы аминокислот «Диа-М» (Россия) и Reanal (Венгрия), пероксидазу из корней хрена («Диа-М», Россия).

Проведение реакции направленного мутагенеза

Точечные замены вводили с помощью двустадийной ПЦР как описано ранее [13, 16]. В качестве матрицы использовали плазмиду, полученную на основе pET-33b(+), в которой ген *tvdaao* находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7. Мутации вводили с использованием прямого (T7_For) и обратного (T7_Rev) праймеров на начало и конец гена соответственно, а также прямого (Mut_For) и обратного (Mut_Rev) праймеров, несущих требуемые замены в гене *tvdaao*. Последовательности праймеров приведены ниже. Полужирным выделены вводимые мутации.

T7_For	5'-taatacgaactcactataggg-3'
T7_Rev	5'-gctagttattgctcagcgg-3'
Ser67Ala_For	5'-gactacgatgcccgtc cg cttatcctatcttgcgagagctg-3'
Ser67Ala_Rev	5'-cgcaagataggataagcgcagcggcatcgtagctggc-3'
Ser77Ala_For	5'-tggctcga g ccagccccgaggctggaa-3'
Ser77Ala_Rev	5'-gggct g gctcgagccagctctcgcaag-3'
Ser78Ala_For	5'-ctcgaagc g ccccgaggctggaattcg-3'
Ser78Ala_Rev	5'-tcgggg g cgcttcgagccagctctcg-3'
Ser105Ala_For	5'-gaaggtgccat g cgcccatctgtcaacgcaac-3'
Ser105Ala_Rev	5'-gacagatggccg cc atggcacctccagtttagg-3'
Ser270Ala_For	5'-ccgaaccggatcct g ctctcaccatcgaaatcctgt-3'
Ser270Ala_Rev	5'-gatgggtgagag g caggatcgggttcggatgacc-3'

Ser277Ala_For 5'-ccatcgaatcctcggctagagccctcgaccgattc-3'
 Ser277Ala_Rev 5'-cgagggtcttagccaggattcgatgggtgagaga-3'
 Ser335Ala_For 5'-gtgctggttaccaggcctcttacggcatggctgat-3'
 Ser335Ala_Rev 5'-gccgtaagaggcctggtaaccagcaccggc-3'
 Ser336Ala_For 5'-ctggttaccagtcgcttacggcatggctgatgaag-3'
 Ser336Ala_Rev 5'-catgccgtaagcggactggtaaccagcaccg-3'.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu-ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл БСА, 1% (об/об) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2.5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2.5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0.5 мкл ДНК-полимеразы Pfu (2.5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0.5 мл (SSI, США) на приборе «Терцик» («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку перед проведением ПЦР добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C, затем реакцию ПЦР инициировали добавлением фермента. Реакцию проводили по следующей программе: первая стадия при 95°C, 30 с; вторая стадия при 54–58°C, 60 с; третья стадия при 72°C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 10 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5°C ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами. Для определения T_m использовали эмпирическую формулу:

$$T_m = 2(nA + nT) + 4(nG + nC),$$

где nX – количество нуклеотидов типа X (X = A, T, C, G) в праймере.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров T7_For/Mut_Rev (фрагмент 1) и Mut_For/T7_Rev (фрагмент 2). Продукты ПЦР, фрагмент 1 и фрагмент 2, очищали электрофорезом в 1% агарозном геле. Затем проводили третью, объединяющую, ПЦР с праймерами T7_For и T7_Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали полученные ранее фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР очищали аналогично в 1% агарозном геле и обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции: в случае замен в положениях 67, 77, 78 и 105 использовали NcoI и Bsp119I, а для замен в положениях 270, 277, 335 и 336 – Bsp119I и XhoI. Фрагменты ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле и лигировали в исходный вектор, обработанный теми же эндонуклеазами рестрикции. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Затем

клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали в течение 16 ч при 37°C. Брали по три колонии каждого мутанта с чашки, и из них выделяли плазмиды. Правильность введения требуемых мутаций контролировали секвенированием плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных форм TvDAAO в клетках *E. coli*

TvDAAO и ее мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение 16 ч при 30°C в 10 мл среды 2YT (бактотриптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, хлорид натрия 5 г/л, рН 7.5) в присутствии 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Утром клетки пересевали на свежую среду (разбавление 1 : 100) и культивировали при 30°C до величины поглощения на длине волны 600 нм A₆₀₀ ≈ 0.6–0.8. Посевной материал вносили в колбы для культивирования в количестве 10% от общего объема среды (модифицированная среда LB – дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 5 г/л, глюкоза 5 г/л, дигидрофосфат натрия 1.5 г/л и гидрофосфат калия 1 г/л, рН 7.5), содержащей 30 мкг/мл канамицина. Культивирование проводили в конических колбах с отбойниками объемом 1 л (объем среды составлял не более 10–15% от объема колбы). Температуру культивирования варьировали в диапазоне 18–27°C, скорость оборотов качалки составляла 120–160 об/мин. После достижения A₆₀₀ ≈ 0.6–0.8 экспрессию фермента индуцировали добавлением в среду ИПТГ до конечной концентрации 0.1 мМ. После индукции клетки культивировали в течение 24 ч, а затем осаждали на центрифуге Eppendorf 5403 (5 мин, 5000 об/мин, +4°C). Полученный осадок ресуспендировали в 0.02 М буфере Трис-НСl (рН 8.0 при 25°C) в соотношении 1 : 4 (масс.). Полученную суспензию хранили при –20°C.

Выделение и очистка мутантных ферментов

Для выделения мутантных TvDAAO суспензию клеток в 20 мМ буфере Трис-НСl рН 8.0 дважды замораживали–размораживали, затем клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугировани-

ем на центрифуге Eppendorf 5804 R (11000 об/мин, 30 мин).

Очистка фермента включала ионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR 10/10 с использованием прибора FPLC фирмы Pharmacia Biotech (Швеция) и обессоливание на носителе Sephadex G-25 [17]. Чистоту препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия на приборе MiniProtean III (BioRad, Австрия) по протоколам фирмы-производителя.

Измерение активности и каталитических параметров TvDAAO

Активность оксидазы *D*-аминокислот определяли с использованием биферментной системы: DAAO–пероксидаза хрена. В качестве субстрата для первого фермента использовали *D*-метионин, для второго – ABTS. Активность определяли при 30°C по накоплению продукта окисления ABTS (поглощение при 414 нм, $\epsilon_{414} = 36600$ л/моль/см) на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли 770 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ), pH 8.0, предварительно насыщенного воздухом, 200 мкл 100 мМ раствора *D*-Met в 50 мМ КФБ, 20 мкл раствора ABTS (16 мг/мл) в воде и 10 мкл раствора пероксидазы в 50 мМ КФБ (5 мг/мл). После термостатирования в течение 10 мин при 30°C в кювету добавляли пробу TvDAAO дикого типа или соответствующих мутантов (30 мкл).

При определении максимальной скорости реакции (V_m) и константы Михаэлиса (K_M) концентрацию соответствующей *D*-аминокислоты варьировали в диапазоне от 0.5 до 5 K_M . Приблизительное значение K_M определяли в отдельном опыте, измеряя скорость реакции при концентрации соответствующей *D*-аминокислоты, равной 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50 мМ. Кинетические параметры V_m и K_M рассчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программы OriginPro 8.5 SR1 (OriginLab). Каталитическую константу k_{cat} рассчитывали из значения V_m . Концентрацию активного фермента определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 455 нм с использованием коэффициента молярного поглощения FAD 10800 м⁻¹см⁻¹ [6].

Исследование термостабильности ферментов

Температурную стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучали в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 8.0. Для каждого опыта готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0.5 мл, содержащих 100 мкл раствора фермента. Пробирки помещали в предварительно нагретый до нужной

температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0.1^\circ\text{C}$). Через определенные промежутки времени отбирали по одной пробирке, быстро охлаждали в течение 1–2 мин во льду и измеряли активность фермента как описано выше. Интервал между отбором проб подбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента уменьшилась до 10–15% от исходной величины. Для определения констант скоростей инактивации строили зависимости остаточной активности фермента от времени в полулогарифмических координатах и обрабатывали их в программе OriginPro 8.5 SR1 (OriginLab) по методике, описанной в [18].

Компьютерное моделирование

Анализ структуры TvDAAO, компьютерное моделирование TvDAAO с аминокислотными заменами и получение изображений белковой глобулы проводили с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор положений в структуре TvDAAO для направленного мутагенеза

Рациональный белковый дизайн является мощным методом изучения структурно-функциональных взаимосвязей и направленного изменения свойств ферментов. Для направленного увеличения температурной стабильности ферментов используют сравнение аминокислотных последовательностей исследуемого фермента и ферментов из термофильных организмов, а также анализ трехмерной структуры (если она доступна хотя бы для одного фермента из семейства) с целью выявления аминокислотных остатков, играющих важную роль в стабильности [19]. Однако в случае TvDAAO такой подход не применим, поскольку это наиболее стабильный фермент из изученных на данный момент оксидаз *D*-аминокислот, а аминокислотные последовательности DAAO из термофильных микроорганизмов до сих пор не определены. Поэтому для повышения термостабильности TvDAAO было решено применить один из общих подходов, основанный на гидрофобизации α -спиралей в структуре фермента [19, 20]. Это может быть достигнуто за счет различных замен, например, Ser→Ala (используются наиболее часто), Lys→Arg, Gly→Ala, Ser→Thr, Lys→Ala, Thr→Ala, Lys→Glu, Glu→Arg, Asp→Arg [21]. В случае замены Ser→Ala, как правило, наблюдается наибольший стабилизирующий эффект. Например, гидрофобизацию α -спиралей в результате замены Ser→Ala использовали для повышения температурной стабильности формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [22].

Мы проанализировали четвертичную структуру TvDAAO для выявления потенциальных остатков Ser в α -спиралях. При отборе остатков Ser, которые можно заменить на Ala, принимали во внимание следующие моменты: 1) эти остатки должны входить в состав α -спиралей; 2) не быть консервативными и не располагаться в активном центре фермента. В результате анализа структуры TvDAAO в α -спиралях всего найдено 11 остатков Ser (рис. 1). Сравнение аминокислотных последовательностей DAAO из разных источников показывает, что остаток Ser44 является консервативным, располагается в коферментсвязывающем домене TvDAAO, и его боковой радикал, согласно компьютерному анализу, образует две водородные связи с молекулой FAD (рис. 2A). Поэтому этот остаток сразу исключили из списка возможных кандидатов на замену. Остатки Ser157 и Ser161 располагаются в области межсубъединичного контакта, и несмотря на то, что они не принимают участия в образовании межсубъединичных водородных связей, их замена также нежелательна [11]. Таким образом, для замены на остатки Ala были выбраны восемь остатков Ser (в положениях 67, 77, 78, 105, 270, 277, 335 и 336). Остатки Ser67, Ser105, Ser335 и Ser336 располагаются внутри белковой глобулы, а Ser77, Ser78, Ser270 и Ser277 экспонированы в раствор. На рис. 2Б–Е положение выбранных остатков показано более подробно. Ser67 находится в середине, а остатки Ser77 и Ser78 на конце α 3-спирали. Ser105 расположен в короткой α 4-спирали, Ser270 и 277 – в α 9-спирали, в ее начале и середине соответственно. Остатки Ser335 и Ser336 расположены в начале α 13-спирали. Все восемь остатков серина образуют от двух до шести водородных связей. Ser78, Ser105 и Ser270 образуют водородные связи с другими аминокислотными остатками полипептидной цепи только с атомами пептидной связи. Поскольку боковой радикал этих остатков не участвует в образовании водородных связей с другими аминокислотами, то замена этих трех остатков на Ala не должна привести к потере водородных связей. Остатки Ser в положениях 67, 77, 277, 335 и 336 образуют водородные связи как с атомами пептидной связи, так и оксигруппами боковых радикалов других аминокислот (рис. 2). С одной стороны, замена этих пяти остатков серина приведет к потере водородных связей, образованных боковым радикалом, что может внести отрицательный вклад в стабильность фермента, но, с другой стороны, повышение гидрофобности α -спирали может стабилизировать белковую глобулу так, что суммарный эффект окажется положительным. Таким образом, замена этих остатков серина представляет собой теоретический интерес с точки зрения влияния двух указанных факторов на стабильность TvDAAO.

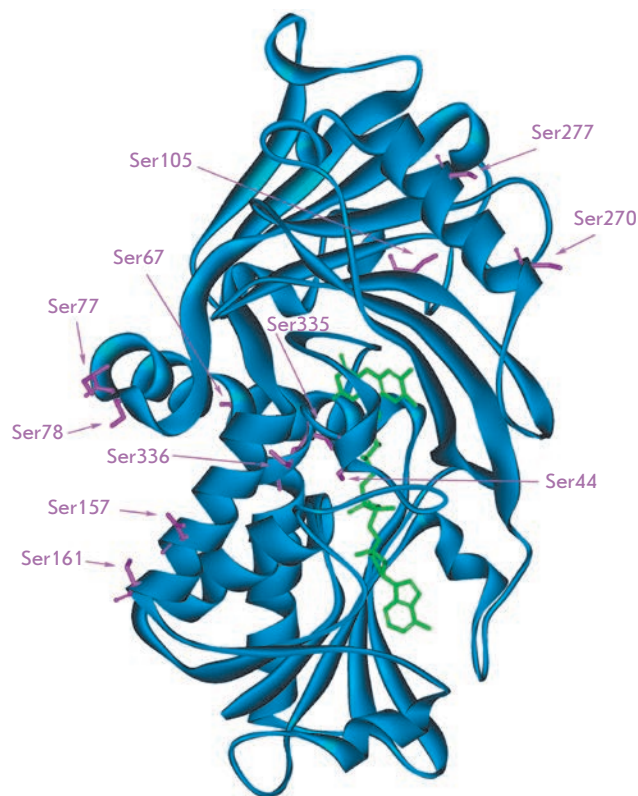


Рис. 1. Общий вид субъединицы TvDAAO с остатками Ser, расположенными в α -спиральных участках

Получение мутантных TvDAAO с заменами Ser/Ala

Нуклеотидные замены в гене *tvdaao*, приводящие к появлению требуемых мутаций, вводили с помощью ПЦР. Секвенировали по три плазмиды для каждого из восьми мутантов гена *tvdaao* и показали, что во всех случаях в гене *tvdaao* были только требуемые мутации, а другие нуклеотидные замены отсутствовали. Плазмиды с генами мутантных TvDAAO трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS. Полученные рекомбинантные штаммы культивировали по методике, приведенной в разделе «Экспериментальная часть». Все восемь мутантных TvDAAO синтезировались в растворимой форме и обладали ферментативной активностью. Две мутантные TvDAAO с заменами Ser78Ala и Ser270Ala в очищенном виде получить не удалось, так как они быстро инактивировались в ходе разрушения клеток, что свидетельствует о сильной дестабилизации белковой глобулы. Остальные шесть мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala были выделены и очищены с помощью анионообменной электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия их чистота составила не менее 99% (рис. 3, дорожки 1–6).

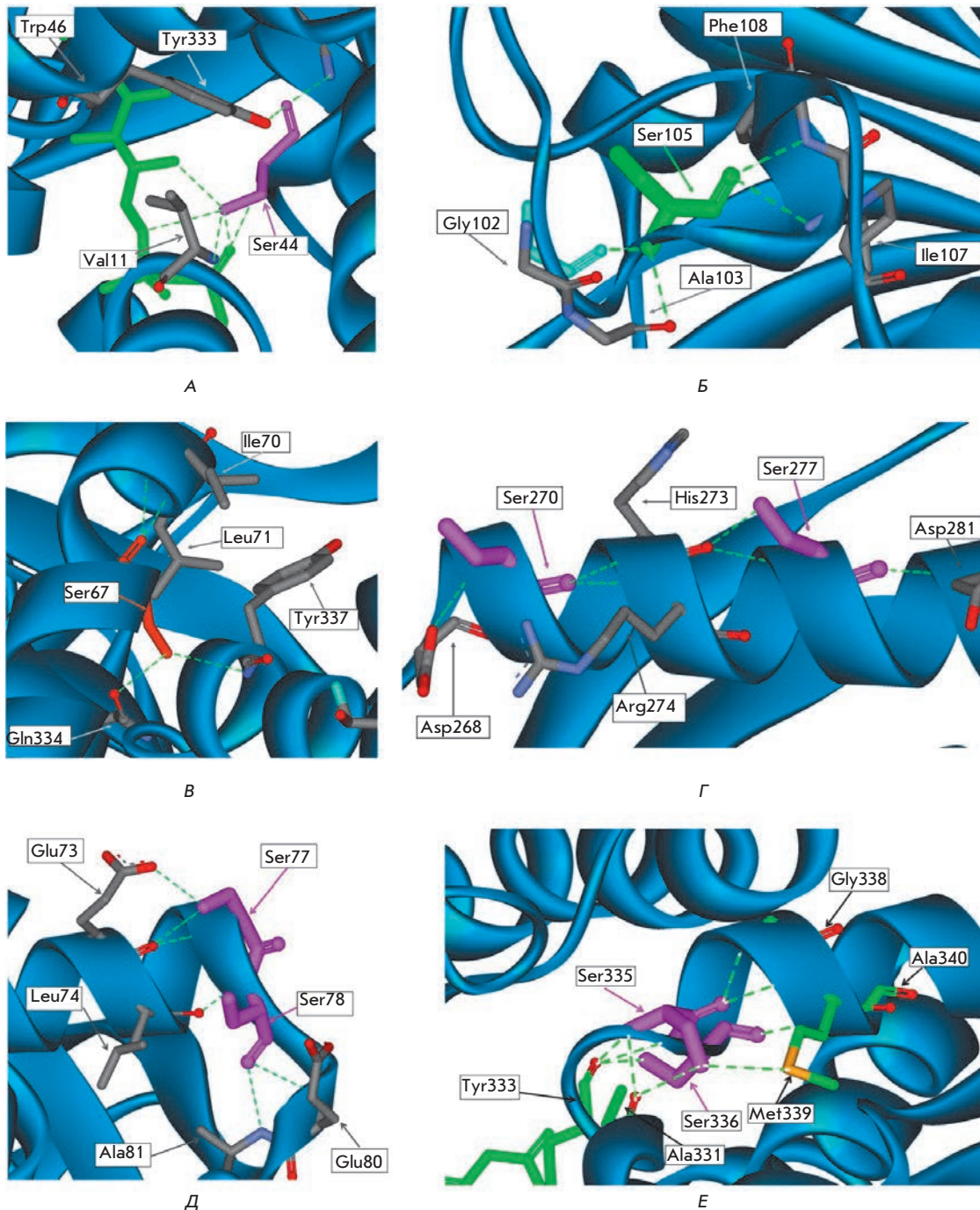


Рис. 2. Расположение и взаимодействие остатков Ser в α -спиралях глобулы TvDAAO. А – Ser44, Б – Ser105, В – Ser67, Г – Ser270 и Ser277, Д – Ser77 и Ser78, Е – Ser335 и Ser336

Каталитические свойства мутантных TvDAAO

Для шести мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala были определены константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы (k_{cat}) с различными D-аминокислотами. Значения k_{cat} , K_M и каталитической эффективности k_{cat}/K_M новых мутантов TvDAAO и фермента дикого типа с различными D-аминокислотами приведены в табл. 1. Полуэир-

ным шрифтом на сером фоне выделено улучшение кинетического параметра по сравнению с параметром фермента дикого типа. Для наглядности на рис. 4 представлены значения каталитической эффективности ($(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100\%$) мутантных TvDAAO относительно значений фермента дикого типа (100%). Из табл. 1 и рис. 4 видно, что введение замен привело к существенному изменению спектра субстратной специфичности. Из всех мутантных

Таблица 1. Кинетические параметры мутантных TvDAAO и фермента дикого типа с различными D-аминокислотами

D-амино-кислота	Форма фермента												
	wt-TvDAAO			TvDAAO Ser67Ala			TvDAAO Ser77Ala			TvDAAO Ser105Ala			
	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	
D-Met	80.5 ± 0.8	0.46 ± 0.03	175	104 ± 3.0	1.35 ± 0.04	77.4	44.0 ± 2.0	0.85 ± 0.09	52.0	153 ± 2.0	1.38 ± 0.04	110	
D-Ala	108.6 ± 2.0	16.7 ± 0.7	6.5	180 ± 13	31.0 ± 4.0	5.8	33.7 ± 1.0	11.1 ± 0.1	3.1	218 ± 8.0	31.3 ± 2.0	7.0	
D-Ser	20.5 ± 0.9	36.6 ± 3.3	0.56	18.4 ± 0.7	36.0 ± 3.0	0.51	7.9 ± 0.2	18.3 ± 0.8	0.43	10.4 ± 0.4	21.4 ± 1.9	0.49	
D-Val	85.3 ± 2.7	14.4 ± 1.2	5.9	133 ± 6.0	21.4 ± 1.6	6.2	19.1 ± 0.5	12.2 ± 0.8	1.56	154 ± 5.0	24.7 ± 1.3	6.3	
D-Trp	22.5 ± 1.9	0.45 ± 0.06	50.0	34.0 ± 4.0	0.87 ± 0.14	38.9	12.4 ± 0.8	6.5 ± 0.7	1.90	50.0 ± 7.0	0.63 ± 0.12	80.0	
D-Trp	42.4 ± 1.4	0.49 ± 0.04	86.5	35.9 ± 1.3	0.53 ± 0.4	67.7	43.7 ± 0.8	0.68 ± 0.03	64.3	38.6 ± 1.6	0.60 ± 0.05	64.6	
D-Leu	29.1 ± 0.3	0.78 ± 0.02	37.3	31.4 ± 0.5	0.34 ± 0.02	93.1	6.2 ± 0.5	0.20 ± 0.04	31.9	30.4 ± 0.4	0.28 ± 0.02	110	
D-Phe	27.2 ± 0.8	0.37 ± 0.04	73.9	30.4 ± 1.2	0.41 ± 0.04	73.6	23.4 ± 0.5	0.32 ± 0.03	73.1	32.3 ± 0.6	0.26 ± 0.02	124.3	
D-Asn	62.4 ± 2.0	22.6 ± 1.5	2.8	49.7 ± 1.7	25.7 ± 1.5	1.94	17.2 ± 1.0	4.7 ± 0.7	3.7	48.3 ± 1.2	14.5 ± 0.7	3.3	
D-Thr	1.75 ± 0.04	11.1 ± 0.8	0.16	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции			
D-Lys	3.54 ± 0.21	29.3 ± 3.4	0.12	Нет реакции			Нет реакции			<1.2	>50	0.04	Нет реакции

D-амино-кислота	Форма фермента											
	TvDAAO Ser277Ala			TvDAAO Ser335Ala			TvDAAO Ser336Ala			TvDAAO Ser336Ala		
	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$
D-Met	48.0 ± 1.0	0.73 ± 0.04	65.8	45.9 ± 1.1	4.6 ± 0.2	9.9	56.8 ± 1.5	2.69 ± 0.13	21.1	2.69 ± 0.13	24.2 ± 1.9	4.2
D-Ala	81.0 ± 3.0	20.4 ± 1.4	4.0	8.2 ± 0.4	10.1 ± 1.2	0.82	101 ± 5.0	24.2 ± 1.9	4.2	Нет реакции		
D-Ser	Нет реакции			34.1 ± 1.7	43.0 ± 5.0	0.79	Нет реакции			Нет реакции		
D-Val	71.0 ± 3.0	34.0 ± 3.0	2.1	20.1 ± 1.3	25.0 ± 3.0	0.82	50.0 ± 2.0	8.2 ± 0.9	6.1	8.2 ± 0.9	24.2 ± 1.9	4.2
D-Trp	0.45 ± 0.06	0.70 ± 0.14	0.65	5.5 ± 0.9	0.58 ± 0.13	9.5	15.8 ± 0.7	0.36 ± 0.03	44.2	0.36 ± 0.03	24.2 ± 1.9	4.2
D-Trp	0.49 ± 0.04	0.26 ± 0.02	1.9	79.0 ± 5.0	1.23 ± 0.11	64.1	57.0 ± 1.0	0.69 ± 0.04	82.0	0.69 ± 0.04	24.2 ± 1.9	4.2
D-Leu	12.0 ± 2.0	0.15 ± 0.02	80.0	5.9 ± 0.1	0.21 ± 0.01	27.5	5.0 ± 0.1	0.07 ± 0.01	76.4	0.07 ± 0.01	24.2 ± 1.9	4.2
D-Phe	15.1 ± 0.4	0.18 ± 0.03	83.9	8.3 ± 0.2	0.38 ± 0.03	21.9	11.8 ± 0.3	0.24 ± 0.02	49.4	0.24 ± 0.02	24.2 ± 1.9	4.2
D-Asn	11.8 ± 1.2	8.0 ± 1.5	1.48	46.0 ± 4.0	26.0 ± 3.0	1.78	32.0 ± 2.0	16.0 ± 3.0	2.0	16.0 ± 3.0	24.2 ± 1.9	4.2
D-Thr	Нет реакции			1.8 ± 0.1	14.0 ± 2.0	0.13	Нет реакции			Нет реакции		
D-Lys	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции		

Примечание. Серым фоном выделены кинетические параметры мутантных TvDAAO, лучшие по сравнению с таковыми для wt-TvDAAO.

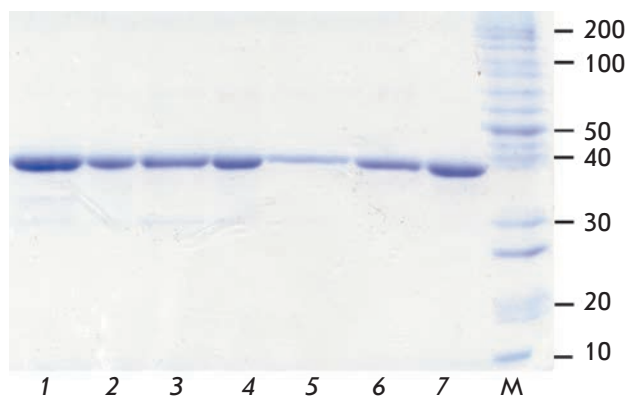


Рис. 3. Аналитический электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala (дорожки 1 – 6 соответственно) и фермента дикого типа (дорожка 7). М – маркер молекулярной массы белков

ферментов активность с *D*-лизиним сохранил только TvDAAO Ser77Ala, с *D*-треонином – только TvDAAO Ser335Ala. Кроме того, стоит отметить повышение каталитической эффективности к *D*-лейцину практически при всех заменах.

Среди отдельных мутантов следует обратить внимание на следующие моменты:

1. TvDAAO Ser67Ala по свойствам близок к ферменту дикого типа со многими субстратами, заметное увеличение каталитической эффективности – в 2.5 раза – наблюдается только с *D*-Leu. С *D*-Thr и *D*-Lys фермент неактивен.

2. TvDAAO Ser77Ala проявляет более высокую каталитическую эффективность только с одним субстратом – *D*-Asn, с *D*-Thr фермент неактивен, существенно снизилась активность с *D*-Tyr, а также с *D*-Met и *D*-Val. Из всех мутантов только этот сохранил активность с *D*-Lys.

3. TvDAAO Ser105Ala обладает наилучшими каталитическими параметрами среди всех мутантных форм, за исключением отсутствия активности с *D*-Thr и *D*-Lys. Каталитическая эффективность снизилась с *D*-Trp в 1.3 и с *D*-Met в 1.6 раза, но возросла с *D*-Tyr, *D*-Phe и *D*-Leu в 1.6, 1.7 и 3.0 раза соответственно.

4. TvDAAO Ser335Ala имеет более высокую каталитическую активность по отношению к *D*-Ser, чем фермент дикого типа. Кроме того, только этот мутантный фермент сохранил активность с *D*-Thr.

Мутантные формы TvDAAO Ser277Ala и Ser336Ala выделяются на общем фоне, поскольку полностью потеряли активность с *D*-Ser, но сохранили активность

с *D*-Ala, что можно использовать для селективного определения *D*-Ala в биологических образцах в присутствии *D*-Ser. Эти ферменты неактивны также с *D*-Thr и *D*-Lys, но имеют более высокую каталитическую эффективность с *D*-Leu.

ТЕМПЕРАТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МУТАНТНЫХ TvDAAO

Стабильность TvDAAO Ser78Ala и Ser270Ala

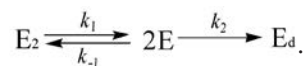
Как отмечено выше, замены Ser78Ala и Ser270Ala привели к сильной дестабилизации белковой глобулы, так что ферменты инактивировались в процессе их выделения из клеток. Компьютерное моделирование показало, что Ser78 и Ser270 не образуют водородные связи своими боковыми радикалами с соседними остатками. Однако в непосредственной близости от них располагаются остатки Glu80 и Asp268 соответственно, с которыми возможно образование водородных связей в растворе как непосредственно, так и через молекулу воды, поскольку в обоих случаях расстояние между оксигруппой серина и карбоксильной группой составляет около 4 Å. Так как Ser78 и Ser270 располагаются на изгибах на конце α3-спирали и в начале α9-спирали соответственно, то, по-видимому, играют важную роль в поддержании стабильности элементов вторичной структуры TvDAAO, о чем говорит сильная дестабилизация при их замене на остатки аланина.

Стабильность TvDAAO Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala

На рис. 5А,Б представлены зависимости остаточной активности мутантов TvDAAO от времени при одинаковой концентрации. Как видно из рис. 5А, замены Ser77Ala и Ser335Ala незначительно снижают стабильность. Замена Ser67Ala на стабильность фермента не влияет, а замена Ser105Ala приводит к заметной стабилизации. Наибольшая дестабилизация белковой глобулы наблюдается в случае замен Ser277Ala и Ser336Ala (рис. 5Б). Для получения кривых инактивации, сопоставимых с кривыми для других мутантов TvDAAO, температуру инкубации пришлось снизить с 56 до 52°C.

МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ МУТАНТНЫХ TvDAAO

Ранее нами было показано [11, 13, 16], что при повышенных температурах инактивация TvDAAO дикого типа и ее различных мутантных форм протекает в соответствии с диссоциативным механизмом:



$$(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100, \%$$

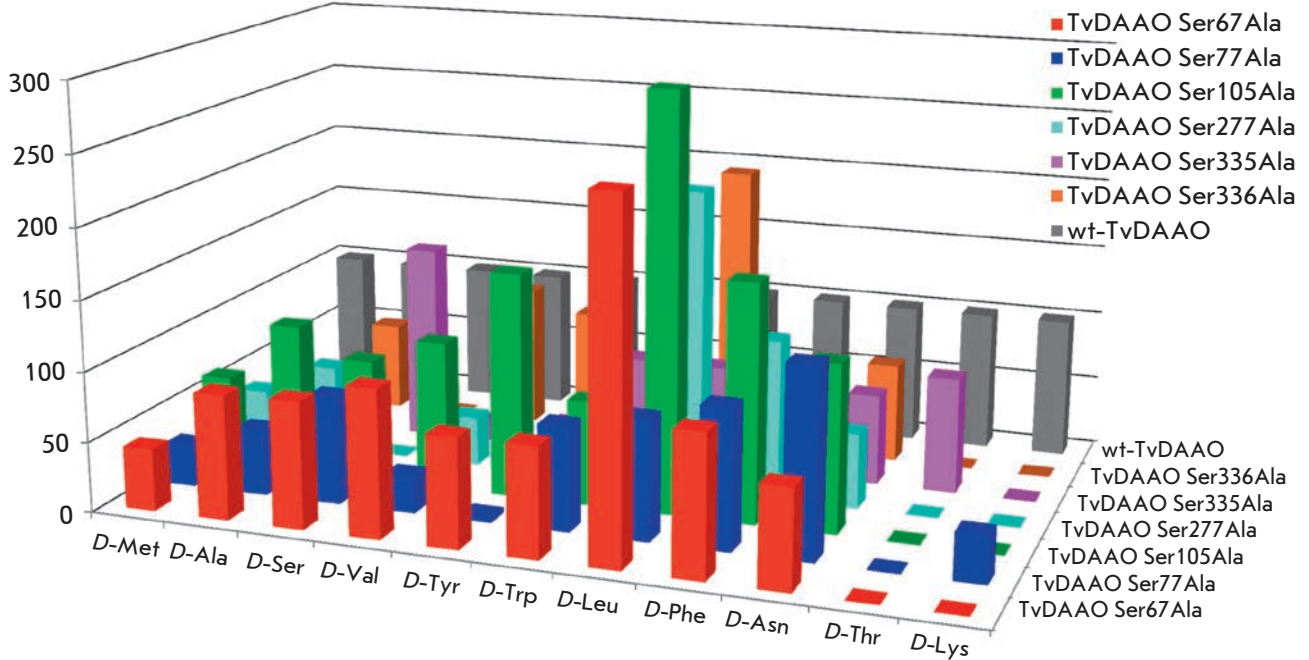


Рис. 4. Относительные значения каталитической эффективности $(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt}$ TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala. Каталитическая эффективность TvDAAO дикого типа принята за 100%

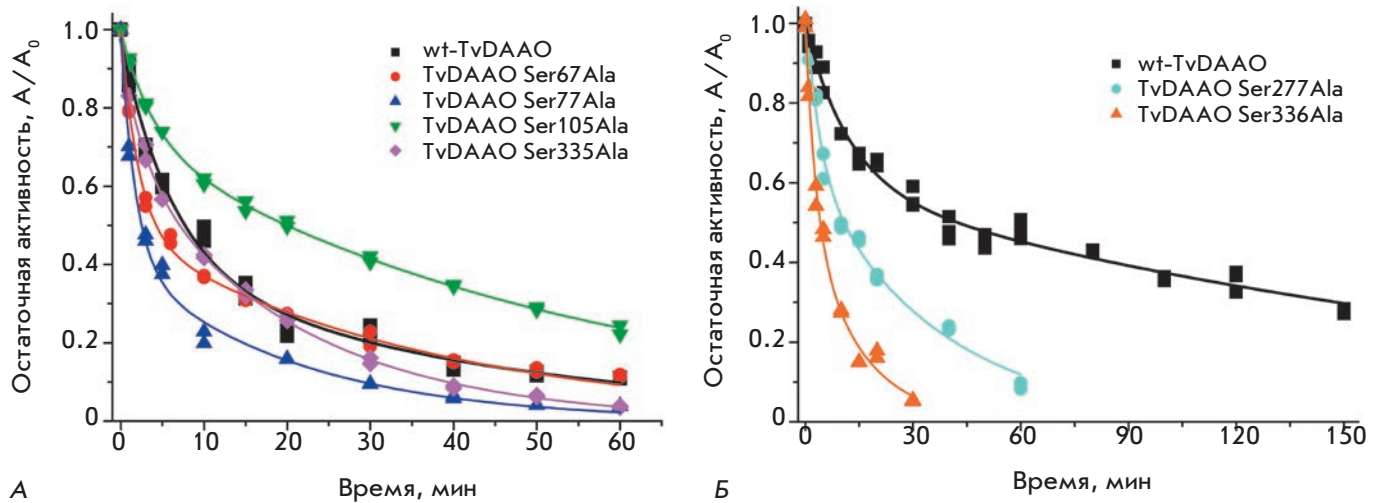
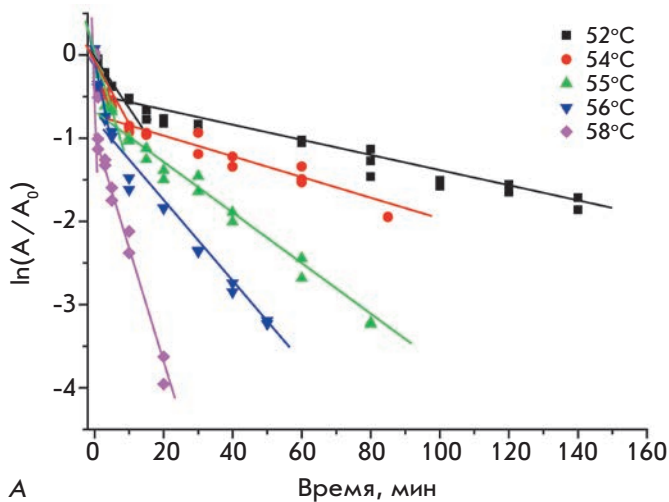


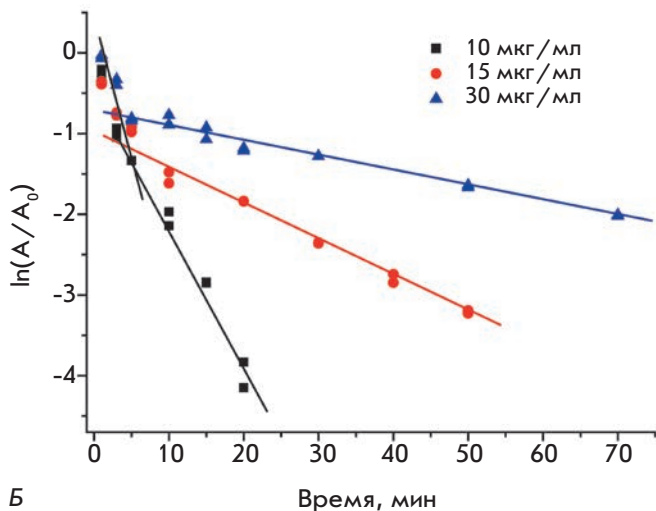
Рис. 5. Зависимость остаточной активности мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala и TvDAAO дикого типа от времени при 56°C. 0.1 М КФБ, pH 8.0, концентрация ферментов – 10 мкг/мл (А), и зависимость остаточной активности мутантных TvDAAO с заменами Ser277Ala, Ser336Ala и TvDAAO дикого типа от времени при 52°C. 0.1 М КФБ, pH 8.0, концентрация ферментов – 10 мкг/мл (Б)

Согласно этому механизму на первой стадии активный димер E_2 обратимо диссоциирует с образованием двух неактивных мономеров E . Далее происходит необратимый переход формы E в денатурированный мономер E_d . Этот механизм был подробно

проанализирован О.И. Полтораком и соавт. в 1998 г. [18]. Зависимость остаточной активности фермента от времени в таком механизме описывается суммой двух экспонент, и скорость инактивации фермента зависит от его концентрации [11, 13, 16]. Диссоциа-



А

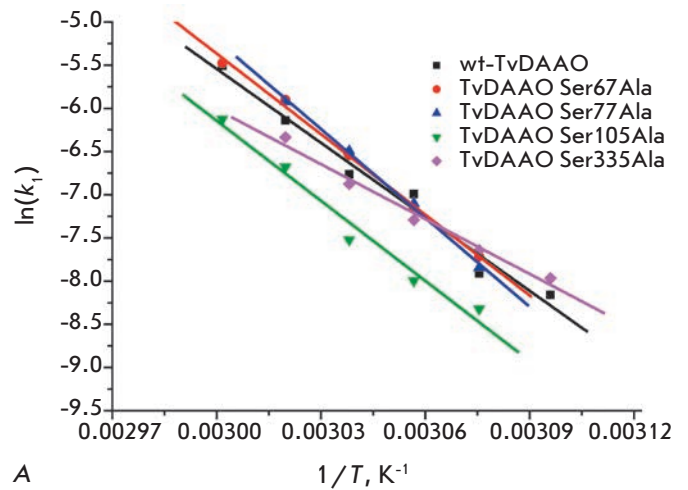


Б

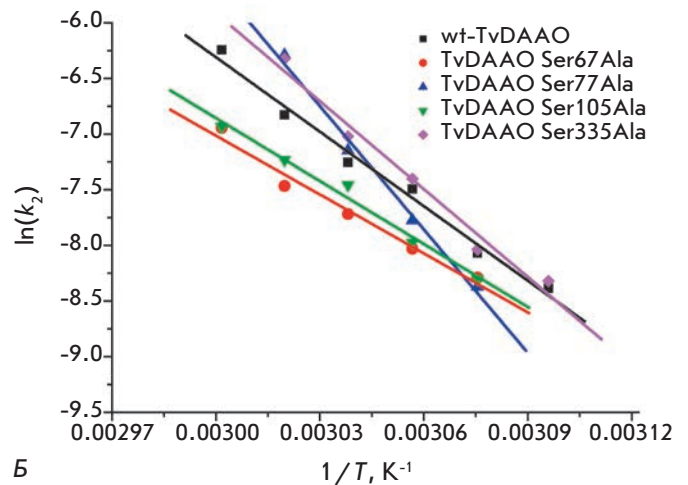
Рис. 6. Зависимости остаточной активности мутантной TvDAAO Ser77Ala от времени в полулогарифмических координатах. А – инактивация при различных температурах и концентрации фермента 15 мкг/мл. Б – инактивация при различных начальных концентрациях фермента при температуре 56°C. 0.1 М калий-фосфатный буфер, pH 8.0

тивный механизм термоинактивации TvDAAO дикого типа наблюдается только в диапазоне температур 50–60°C, когда значения констант скоростей k_1 и k_2 сопоставимы друг с другом. Поскольку константа скорости k_1 с ростом температуры увеличивается гораздо быстрее, чем константа скорости k_2 , то при температурах ниже 50 и выше 60°C лимитирующими становятся соответственно первая и вторая стадии, а кинетика инактивации в этих условиях описывается одной экспонентой, как для мономолекулярных реакций.

Анализ зависимостей остаточной активности от времени свидетельствует, что у мутантных



А



Б

Рис. 7. Зависимость констант скоростей первой (А) и второй (Б) стадий термоинактивации мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala и TvDAAO дикого типа в 0.1 М КФБ, pH 8.0 от температуры в полулогарифмических координатах $\ln(k_{in}) - 1/T$

TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala (рис. 5А) и Ser277Ala и Ser336Ala (рис. 5Б) механизм термоинактивации также не отличается от механизма инактивации фермента дикого типа. На рис. 6А,Б в качестве примера в полулогарифмических координатах приведены зависимости остаточной активности мутанта TvDAAO Ser77Ala от времени инкубации при различных температурах и концентрациях. Аналогичные зависимости получены и для всех остальных мутантных ферментов. Наличие точек излома на кривых термоинактивации в полулогарифмических координатах при различных температурах и увеличение тангенса угла на-

Таблица 2. Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO и дикого типа

Мутантная форма	Параметр, с ⁻¹	Температура, °C							
		46	48	50	52	54	56	58	60
TvDAAO Ser67Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	4.45	7.8	14.4	27.4	41.8
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.51	3.25	4.44	5.7	9.6
TvDAAO Ser77Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	3.92	8.3	15.1	26.7	-
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.31	4.20	7.9	18.5	-
TvDAAO Ser105Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	2.43	3.37	5.4	12.6	21.9
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.48	3.44	5.8	7.2	9.7
TvDAAO Ser277Ala	$k_1 \cdot 10^4$	3.02	5.4	10.2	14.4	25.9	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4$	0.93	1.41	3.25	3.91	7.6	-	-	-
TvDAAO Ser335Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	3.47	4.80	6.8	10.3	17.7	-
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	2.43	3.23	6.1	8.9	17.9	-
TvDAAO Ser336Ala	$k_1 \cdot 10^4$	2.88	6.8	13.8	28.4	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4$	0.90	3.67	9.3	18.5	-	-	-	-
wt-TvDAAO	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	2.86	3.67	9.2	11.6	21.5	40.5
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	2.28	3.13	5.6	7.1	10.8	19.4

Примечание. Уменьшение констант скорости у мутантов по сравнению с константами фермента дикого типа выделено зеленым фоном, а ухудшение – бордовым. Разными оттенками показаны эффекты различной степени – большему эффекту соответствует более темный оттенок.

клона второго линейного участка при уменьшении начальной концентрации фермента подтверждает то, что процесс термоинактивации протекает по диссоциативному механизму [18]. Из экспериментальных зависимостей остаточной активности фермента от времени инкубации мы рассчитали константы скорости термоинактивации мутантных форм TvDAAO Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala для обеих стадий процесса (табл. 2).

В случае TvDAAO с мутациями Ser277Ala и Ser336Ala температурный диапазон, в котором реализуется диссоциативный механизм, сместился на 4 °C в сторону низких температур по сравнению с диапазоном фермента дикого типа, причем TvDAAO Ser336Ala был наименее стабильным из всех полученных в очищенном виде мутантов (рис. 5Б, табл. 2). При температуре 52 °C (кинетические кривые для которой приведены на рис. 5Б) замены Ser277Ala и Ser336Ala привели к увеличению константы скорости инактивации первой стадии в 3.9 и 7.7 раза, а второй стадии – в 1.2 и 5.9 раза соответственно (табл. 2). Таким образом, в случае замены Ser336Ala эффект дестабилизации связан как с первой стадией инактивации – диссоциацией фермента на мономе-

ры, так и со второй стадией – денатурацией белковой глобулы. Замена Ser277Ala приводит главным образом к увеличению скорости инактивации на первой стадии, однако эффект не столь значительный, как при замене Ser336Ala. Причиной большего эффекта дестабилизации фермента с заменой Ser336Ala может быть то, что остаток Ser336 находится на конце $\alpha 13$ -спирали и образует водородную связь с пептидной связью остатка Tyr333, который, в свою очередь, располагается в близком контакте с Si-стороной изоаллоксазинового цикла FAD и консервативным остатком Ser44 (рис. 2Е). Кроме того, Ser336 и Tyr333 встречаются в соответствующих положениях у оксидаз D-аминокислот, наиболее гомологичных TvDAAO и, по-видимому, играют важную роль в поддержании конформации, требуемой для связывания кофактора. Остаток Ser277 находится в середине $\alpha 9$ -спирали на поверхности фермента (рис. 2Г) и образует одну водородную связь с карбонильным атомом кислорода пептидной связи остатка His273, потеря которой, возможно, отрицательным образом сказывается на температурной стабильности TvDAAO.

Температурный диапазон, в котором инактивация ферментов с заменой четырех остатков Ser (67, 77,

105 и 335) происходит по диссоциативному механизму, остался прежним, однако значения констант скоростей термоинактивации изменились по сравнению с ферментом дикого типа (табл. 2).

Как уже отмечалось, константы скоростей первой и второй стадий по-разному зависят от температуры. На рис. 7А,Б представлены зависимости величины $\ln(k)$ от $1/T$ для констант скоростей первой и второй стадии соответственно.

Замена Ser105Ala приводит к увеличению стабильности фермента во всем температурном диапазоне – от 52 до 60°C (табл. 2, рис. 5А), причем зависимости констант скоростей термоинактивации для обеих стадий очень близки к значениям у фермента дикого типа, но при этом в диапазоне от 52 до 60°C располагаются на соответствующих графиках ниже (рис. 7А,Б). Замена Ser105Ala привела к повышению термоустойчивости TvDAAO в среднем в 2 раза по сравнению с ферментом дикого типа на первой стадии термоинактивации и в 1.5 – на второй, что ощутимо для этого фермента. Сходный эффект стабилизации наблюдается на второй стадии инактивации мутантной формы TvDAAO Ser67Ala – приблизительно в 1.6 раза, причем температурная зависимость константы скорости инактивации также близка к зависимости у фермента дикого типа, но по параметрам первой стадии термоинактивации TvDAAO Ser67Ala немного уступает исходному ферменту во всем температурном диапазоне – стабильность упала в среднем на 20%. Тем не менее эта замена также вызывает суммарную стабилизацию фермента, хоть и меньшую, чем замена Ser105Ala. Остатки Ser67 и Ser105 находятся внутри белковой глобулы в середине α 3-спирали и в короткой α 4-спирали. Оксигруппа остатка Ser105 не образует водородных связей с соседними остатками и находится рядом с гидрофобными остатками Leu100, Ala103 и Ile107, в то время как оксигруппа Ser67 образует две водородные связи с атомами полипептидной цепи остатков Gln334 и Tyr337, но при этом также находится в непосредственной близости к гидрофобным остаткам Trp51, Leu70, Leu71 и бензольному кольцу остатка Tyr337. При замене Ser105Ala возможно усиление гидрофобных взаимодействий внутри белковой глобулы без нарушения каких-либо водородных связей, что, вероятно, и приводит к увеличению температурной стабильности TvDAAO. Кроме того, в трехмерной структуре фермента могут, по-видимому, возникать некоторые конформационные изменения, приводящие к стабилизации димера и улучшению его каталитических свойств. В случае же замены Ser67Ala пропадают две водородные связи с остатками Tyr337 и Gln334, которые находятся в пространственно-сближенной α 13-спирали, но при этом могут усиливаться гидро-

фобные взаимодействия, что способствует стабилизации белковой глобулы, о чем говорят результаты экспериментов.

Особенностью мутантов TvDAAO Ser77Ala и TvDAAO Ser335Ala является то, что они отличаются от остальных мутантных форм температурными зависимостями констант скоростей первой и второй стадий инактивации (рис. 7А,Б). У мутанта с заменой Ser77Ala константы скорости первой и второй стадий растут с температурой быстрее, чем у фермента дикого типа, причем для k_2 зависимость более существенная (рис. 7Б), что суммарно выражается в более низкой стабильности TvDAAO Ser77Ala при температуре выше 54°C, тогда как при более низких температурах этот мутант более стабилен, чем фермент дикого типа. У TvDAAO Ser335Ala температурные зависимости констант скорости инактивации k_1 и k_2 разнонаправленно отличаются от зависимостей фермента дикого типа – k_1 в меньшей степени растет при увеличении температуры, в то время как k_2 сильнее зависит от температуры. В результате TvDAAO Ser335Ala оказывается более стабильным, чем фермент дикого типа на первой стадии инактивации при температуре > 54°C, а на второй стадии при температуре < 50°C. Таким образом, ввиду сложной температурной зависимости констант обеих стадий инактивации, стабильность TvDAAO Ser335Ala при каждой температуре определяется соотношением констант каждой стадии инактивации, но тем не менее суммарно несущественно отличается от стабильности фермента дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы изучено влияние гидрофобизации α -спиралей в структуре оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* путем замены восьми остатков серина на остатки аланина. С точки зрения взаимосвязи структуры и стабильности TvDAAO интересен тот факт, что замены остатков Ser на поверхности в положениях 77, 78, 270 и 277 дестабилизируют фермент, в то время как замены Ser 67, 105, 335 и 336 внутри белковой глобулы приводят к снижению стабильности только в одном случае из четырех. Также следует отметить, что замены остатков серина, расположенных на концах α -спиралей, также негативно влияют на температурную стабильность фермента. Эти данные прямо противоположны результатам, полученным для формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [22]. Наибольший эффект стабилизации этого фермента (1.6 раза) наблюдался при замене Ser131, расположенного на поверхности белковой глобулы, на остаток Ala. Кроме того, эффект стабилизации обнаружен и при замене Ser184, расположенного на самом конце спирали α 6 [22]. Та-

ким образом, можно сделать вывод, что, несмотря на универсальность подхода по стабилизации белков за счет гидрофобизации α -спиралей, величина и эффект изменения стабильности непосредственно зависят от особенностей структуры конкретного белка или фермента.

В заключение хочется упомянуть, что в практике белковой инженерии встречаются случаи, когда введение одной аминокислотной замены приводило к существенной стабилизации фермента [23, 24]. Однако, как правило, задача повышения температурной стабильности может быть решена путем объединения нескольких успешных точечных мутаций,

каждая из которых в отдельности имеет умеренный эффект стабилизации, в то время как температурная стабильность многоточечного мутантного фермента становится значительной [12]. Таким образом, метод гидрофобизации α -спиралей может рассматриваться не как основной, но как дополнительный подход к увеличению стабильности ферментов в силу небольших эффектов стабилизации при введении точечных аминокислотных замен. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 14-04-00859-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Khoronenkova S. V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 1. P. 40–54.
2. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. № 13. P. 1511–1518.
3. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M.S., Molla G. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. № 11. P. 1373–1394.
4. Pollegioni L., Molla G. // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. № 6. P. 276–283.
5. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. № 1. P. 1–16.
6. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. № 2. P. 467–473.
7. Gabler M., Hensel M., Fischer L. // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 27. № 8. P. 605–611.
8. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. V. 65. P. 627–633.
9. Geueke B., Weckbecker A., Hummel W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. № 6. P. 1240–1247.
10. Savin S.S., Chernyshev I.V., Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Moscow Univ. Chem. Bul.* 2006. V. 61. № 1. P. 13–19.
11. Cherskova N., Khoronenkova S., Tishkov V. // *Rus. Chem. Bull.* 2010. V. 59. № 1. P. 1–7.
12. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. № 2–3. P. 89–110.
13. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Rus. Chem. Bull.* 2012. V. 61. № 7. P. 1489–1496.
14. Wong K.-S., Fong W.-P., Tsang P.W.-K. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 27. № 1. P. 78–84.
15. Wang S.-J., Yu C.-Y., Lee C.-K., Chern M.-K., Kuan I.-C. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 8. P. 1415–1422.
16. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. № 10. P. 1181–1189.
17. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 374. № 2. P. 405–410.
18. Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y. // *Biochemistry (Moscow)*. 1998. V. 63. № 3. P. 303–311.
19. Munoz V., Serrano L. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 399–409.
20. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. P. 275–296.
21. Rose G., Geselowitz A., Lesser G. // *Science*. 1985. V. 229. № 7. P. 834–838.
22. Rojkova A., Galkin A., Kulakova L., Serov A., Savitsky P., Fedorchuk V., Tishkov V. // *FEBS Lett.* 1999. V. 445. № 1. P. 183–188.
23. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Tishkov V.I. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. V. 25. № 11. P. 781–788.
24. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. P. 1199–1209.

UDC 576.5 : 57.052

Changes in Gene Expression Associated with Matrix Turnover, Chondrocyte Proliferation and Hypertrophy in the Bovine Growth Plate

E. V. Tchetina¹, F. Mwale², A. R. Poole³

Joint Diseases Laboratory, Shriners Hospitals for Children and Departments of Surgery and Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Present Addresses:

¹Clinical Immunology Department, Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation²Orthopaedics Research Laboratory, Jewish General Hospital, Lady Davis Institute for Medical Research, Division of Orthopedic Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada³Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

*E-mail: etchetina@mail.ru

Received 23.01.2014

ABSTRACT The aim of the study is to investigate the interrelationships between the expression of genes for structural extracellular matrix molecules, proteinases and their inhibitors in the bovine fetal growth plate. This was analyzed by RT-PCR in microsections of the proximal tibial growth plate of bovine fetuses in relationship to expression of genes associated with chondrocyte proliferation, apoptosis, and matrix vascularization. In the resting zone the genes for extracellular matrix molecule synthesis were expressed. Extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors were also expressed here. Onset of proliferation involved cyclic upregulation of cell division-associated activity and reduced expression of extracellular matrix molecules. Later in the proliferative zone we noted transient expression of proteinases and their inhibitors, extracellular matrix molecules, as well as activity associated with vascularization and apoptosis. With the onset of hypertrophy expression of proteinases and their inhibitors, extracellular matrix molecules, as well as activity associated with vascularization and apoptosis was significantly upregulated. Terminal differentiation was characterized by high expression of proteinases and their inhibitors, extracellular matrix molecules, as well as activity associated with apoptosis. This study reveals the complex interrelationships of gene expression in the physis that accompany matrix assembly, resorption, chondrocyte proliferation, hypertrophy, vascularization and cell death while principal zones of the growth plate are characterized by a distinct signature profile of gene expression.

KEYWORDS growth plate, gene expression, proteinases, chondrocyte differentiation.

ABBREVIATIONS ECM – extracellular matrix; MMP – metalloproteinase; TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases; HAS – hyaluronic acid synthase; COL – collagen; ADAMTS – A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs; FGF – fibroblast growth factor; PTHrP – parathyroid hormone related peptide; Cbfa1 – core-binding factor subunit alpha-1 (CBF-alpha-1); TGFβ1 – transforming growth factor beta 1; Ihh – Indian hedgehog; VEGF – vascular endothelial growth factor; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1; GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RNA – ribonucleic acid; RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; cDNA – complementary DNA.

INTRODUCTION

Endochondral ossification is a process involving chondrogenesis, chondrocyte hypertrophy, matrix mineralization, and vascularization followed by bone formation [1]. It begins during long bone formation in the embryo. After birth until adulthood, growth of the long bone is

centered in the cartilagenous growth plates, leading to an increase in bone length and epiphyseal growth. It is also an essential component of fracture repair.

In the growth plates distinct zones can be observed. Cells of the resting zone chondrocytes produce large amounts of extracellular matrix (ECM). In contrast cells

of the proliferative zone divide to give rise to columns of flattened cells that also secrete an ECM. At this time they express cell cycle-related genes such as cyclins. In the zone of maturation the cells round up and begin to enlarge into hypertrophic chondrocytes. The upper hypertrophic zone is characterized by cells that have enlarged 5- to 10-fold by a reduction in matrix volume per total tissue volume and which synthesize type X collagen [2–4]. In the lower hypertrophic zone calcification of the extracellular matrix occurs mainly in the longitudinal septa. The mineralization process, in combination with low oxygen tension, attracts blood vessels from the underlying primary spongiosum. Subsequently, the mineralized chondrocytes undergo apoptotic cell death [5].

The ECM of chondrocytes is a complex structure although 3 structural entities can be distinguished [6]. One of them is the complex of aggrecan molecules bound to hyaluronan and assembled into large aggregates. It is responsible for the cartilage compressive stiffness creating a highly hydrated matrix the expansion of which is constrained by a network of collagen fibrils composed of type II collagen, as well as a filamentous network of type VI collagen. Type II collagen fibrils contain a number of molecules at their surface, such as type IX collagen, decorin and fibromodulin. The key role of this network is to provide the tensile properties of this tissue. The non-fibrillar filaments of type VI collagen are involved both in cell-matrix and matrix-matrix interactions [6].

Changes in composition of the ECM occur as chondrocytes divide and mature. Metalloproteinases (MMPs) are generally considered to play a principal role in the cleavage of matrix macromolecules including type II collagen and aggrecan [3]. Only collagenases such as MMP-13, MMP-14 and cathepsin K, are capable of cleaving the triple helix of type II collagen [6]. This results in the unwinding (denaturation) of the triple helical domain which becomes susceptible to secondary cleavage by collagenases and other metalloproteinases such as stromelysin-1 (MMP-3) and gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9, respectively) [7]. MMP-13 is involved in the resorption of type II collagen that occurs during chondrocyte hypertrophy [8, 9]. Proteoglycan aggrecan can be cleaved by MMPs and by aggrecanases -1 and -2, ADAMTS-4 and ADAMTS-5, respectively [10]. In contrast the mechanism of type VI collagen degradation remains unclear. It is resistant to several extracellular matrix metalloproteinases in vitro including collagenases [11]. In cartilage MMP-2 or membrane-bound MMPs may be involved in its cleavage [12].

The activity of MMPs is further regulated by a family of specific inhibitors – tissue inhibitors of

metalloproteinases, namely TIMPs -1, -2, -3 and -4 [13]. TIMP-1 and -2 inhibit the activity of all MMPs, whereas TIMP-3 only inhibits MMP-1, -2, -3, -9 and -13 [14]. Besides inhibiting MMPs, TIMPs also appear to perform other functions. TIMP-1 and -2 exhibit growth factor activity [15] and TIMP-3 is an active mitogen [16].

The complex coordinated regulation of chondrocyte maturation in the growth plate is exerted both by the systemic hormones and chondrocyte autocrine growth factors [5]. In our previous studies of the bovine growth plate we have shown two peaks of gene expression [17]. An increase in gene expression in the early proliferative zone was associated with the upregulation of the regulatory growth factors *FGF-2* and *PTHrP*. In contrast the second more pronounced peak of gene expression in the early hypertrophic zone was accompanied by the increase in *Cbfa1*, *TGFβ1* and *Indian hedgehog (Ihh)* expression. In the present study we extend the previous investigations to explore the relationships of gene expression patterns of matrix proteins to other proteinases and their inhibitors to the cellular and extracellular changes that occur in the physis of the bovine growth plate. These observations help provide more insight into the complex interrelationships of the expression of these molecules during this critical stage in endochondral ossification.

EXPERIMENTAL

Tissue Preparation

Bovine fetuses obtained from a local abattoir immediately after the slaughter of pregnant cows, were transported to the laboratory. Fetal age was determined by measurement of tibial length [18]. Fetuses ranged from 190 to 210 days old. Tissue preparation was essentially as described [2, 8]. Only blocks of growth plate with a flat fracture surface were used. Tissue blocks were trimmed to provide cross-sectional areas of approximately 25 mm². One hundred micrometer thick transverse sections were cut parallel to the fracture face (using a Vibratome; Ted Pella, Inc., California, USA), starting at the fracture face and extending through the hypertrophic zone into the upper proliferative zone of fetal bovine growth plate. They represented tissue labeled as A, B, C, and so on, from the fracture face. Their locations have been previously characterized [2, 8]. A series of sections of four growth plates was pooled (A with A and B with B, etc.) to permit collection of a sufficient amount of tissue for the analyses. Wet weights were determined immediately after sectioning: the weights ranged from 10 to 15 mg, depending on the sample. The weights of samples A and B were lower due to some irregularity of the fracture face.

Total RNA Isolation and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated by a modification of the method of Chomczynski and Sacchi, which was described previously [9]. The RT-reaction was performed using total RNA isolated from the cartilage in a total volume of 20 µl using SuperScript TMII H-Reverse Transcriptase (as recommended by Invitrogen, Canada, Inc.).

Oligo sequences used for PCR are shown in Table. PCR was performed in a total volume of 25 µl containing: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0.8 µM of each primer, 1 µl of RT mixture and 2.5 units of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer). The 30 cycles of PCR included denaturation (95°C, 1 min), annealing (50°C, 1 min) and extension (72°C, 5 min). After agarose (1.6%) gel electrophoresis, PCR products were visualized by ethidium bromide staining. GAPDH was used as reference for gel loading. The band intensities were determined to be below saturation by dilution analyses. Each analysis was performed at least 3 times at different dilutions of each sample of the original cDNA. The result of the single dilution for all the samples in a given set which showed most clearly differences in expression (e.g. COL2A1) is presented in Fig. 2 and 3. Results were analyzed using NIH 1.60 software to determine the pixel intensity for each band and autobackground subtraction was used to control for background signal (Fig. 3). These results were reproducible for growth plates from three different fetuses.

The isolated clones of each amplified cDNA fragment were sequenced (Sheldon Center, McGill University) to

verify the identity of each cDNA product. To confirm the lack of chromosomal DNA contamination of RNA samples, PCR was also performed with RNA aliquots. To avoid variation in efficiency between experiments, all sections were simultaneously subjected to reverse transcription and all samples of cDNA were simultaneously amplified in PCR.

RESULTS AND DISCUSSION

Sequential transverse sections of the bovine tibial primary proximal growth plate (Fig. 1), which represent the hypertrophic (A-C), proliferative (D-J) and resting (K-L) zones [17], were generated. Using RT-PCR analyses of sequential transverse sections of the growth plate cartilage the expression of markers of chondrocyte proliferation and terminal differentiation has already been determined [17]. Here we present our analyses of gene expression of ECM proteins, HA synthase-2, and proteinases in the bovine fetal growth plate in the course of chondrocyte differentiation. We repeated these analyses several times on different fetuses. The data that is shown is representative of our repeated analyses. The data describing the expression of GAPDH, *cyclin B2*, COL2A1, COL10A1, *osteocalcin*, MMP-13 and MMP-9 is reproduced from our previous study [17] for reference.

In our RT-PCR analyses (Fig. 2) and its schematic presentation in relationship to GAPDH expression (Fig. 3) the onset of proliferation was defined at section J where the upregulation of the *cyclin B2* expression is observed. The onset of terminal differentiation was considered as sample C, where the expression of COL10A1 the marker of hypertrophic chondrocytes is first detected.

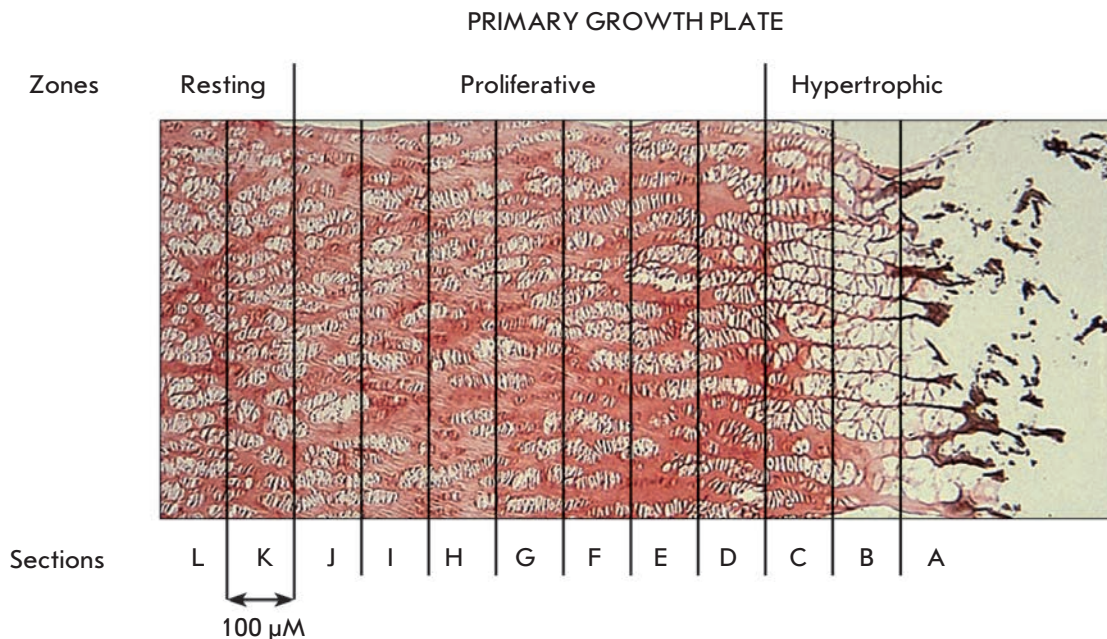


Fig. 1. Representation of the organization of the primary growth plate showing sampling sites extending from the hypertrophic zone through the proliferative zone into the resting zone

The resting zone

The resting zone (sections L and K) is characterized by the expression of extracellular matrix genes, namely *COL2A1*, *COL6A3*, *fibromodulin* and *decorin* being highest in section K. *HAS-2* expression is more

pronounced (in section L) than that of *aggrecan* in section K. *Osteocalcin* expression is also detected in section L. Of the proteinases tested *cathepsin K*, *MMP-14*, *MMP-13* (weakly) and *MMP-3* were all expressed in this zone. In contrast the expressions of the MMP in-

Oligo sequences used for PCR

Genes	Direct primer	Reverse primer
Collagenase 3 (MMP-13)	GATAAAGACTATCCGAGAC	GAGTAACCGTATTGTTCG
Membrane type 1-MMP (MMP-14)	GCATCCAGCAACTTTATG	CATCTGTGACGGAACTTTG
Stromelysin-1 (MMP-3)	TGCGTGGCAGTTTGCTCAGCC	GAGGTGACTCCACTCACATTC
Gelatinase A (MMP-2)	GCTACACACCTGATCTG	GACGGCAAGTATTGTTCTG
Gelatinase B (MMP-9)	GCAGAGGAATACCTGTAC	CACAACATCACCTACTG
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)	GAAAACTGCAGGATGGAC	CACCAAGACCTACACTGTTG
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)	GGATATAGAGTTTATCTACAC	CATGATCCCGTGCTACATCTC
Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3)	CTTAGGCTGGAGGTCAACAAG	CAAGAACGAGTGTCTGGAC
Osteocalcin (bone Gla protein)	CTTTGTGTCCAAGCAGGA	CTATCGGCGCTTCTAC
Procollagen type II (COL2A1)	GAACCCAGAACAACAATCC	GTTCCGACTTTTCTCCCCTCT
Procollagen type X (COL10A1)	CTGAGCGATACCAAACACC	GTAAAGGTGTATCACTGAGAGG
Cyclin B2	GTTGACTATGACATGGTG	GTTCTGTCACTTTGTCTTG
Procollagen type VI (COL6A3)	CATGCTTTGATTTACACTCG	CACTGCTGGTGTATTATGTG
Fibromodulin	CAAGGCAATAGGATCAATG	GTTTGGCTTATGGAAGGTC
Decorin	TGAGTTTCAACAGCATCTCTGC	GTGAGCCTTTTCAGCAACC
Aggrecan	TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC	TGTTCCCTGCAATTACCACCTCC
Hyaluronan synthase 2 (HAS-2)	CTCATCAATAAGTGTGGCAG	CCTATATACCTCACTAGCC
Cathepsin K	GTGTGTCTGAGAATGATGGCTG	CAGCAAAGGTGTGTATTATG
Aggrecanase-1 (ADAMTS-4)	ACCACTTTGACACAGCCATTC	TGCTCTCGGACCTGTGGGGGT
Aggrecanase-2 (ADAMTS-5)	TGTGCTGTGATTGAAGACGAT	CCATCTACCGCTCCTGCAC
Caspase 3	CTGGTACAGATGTCGATGCAG	CATTGAGACAGACAGTGGTG
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	GTTTCATGGATGTCTATCAG	GCACAACAAATGTGAATGCAG
Plasminogen activator inhibitor (PAI-1)	GATCCAAGAGGCAATGCAATTC	GATCAGCGACTTACTTGGTG
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC	AGCTCATTTCCTGGTATGACAACG

hibitors *TIMP-1* (strongly) and *TIMP-2* (weakly) and *TIMP-3* (strongly but only in section K) were detected. In contrast there was no expression of the gelatinases *MMP-2*, *MMP-9* nor of the aggrecanases *ADAMTS-4* and *-5* in sections L and K. *Caspase 3* was expressed only in section K where *MMP-3* and *TIMP-3* expression was strong.

Proliferative zone

The upregulation of *cyclin B2* in section J indicates the beginning of chondrocyte proliferation in the growth plate. This is associated with the downregulation of expression of all matrix proteins tested, namely *COL2A1*, *aggrecan*, *HAS-2*, *fibromodulin* and *decorin*, *osteocalcin* as well as *TIMPs* and proteinases previously upregulated. No expression of *COL6A3* and *caspase 3* was detected in this section and expression did not reappear until the lower proliferative zone in section E and D respectively. The expressions of *aggrecan*, *HAS-2*, *osteocalcin*, *TIMPs*, *MMP-13* and *MMP-14*, *ADAMTS-4* and *-5* were absent or markedly reduced in the central proliferative zone.

In section I *cyclin B2* expression was downregulated although its expression level was up again in section H dropping until section D when it rose again. Expression of *COL2A1* was maintained until section D when it rose with that of *COL6A3*, *fibromodulin*, *decorin* and *cathepsin K*, *MMP-13*, *MMP-3* and *caspase 3*. Chondrocytes in section E also expressed *COL6A3*, *fibromodulin*, *ADAMTS-4* and *MMP-9*, which also rise in section F. Expression of *TIMPs-1* and *-2* started to rise again, where *MMP-13* and *MMP-14* were weakly coexpressed with *MMP-3* in this region.

Caspase 3 expression in section D immediately preceded that of the hypertrophic chondrocytes phenotype identified by expression of *COL10A1* in section C. This is where *cathepsin K* expression reached a peak with *MMP-3* and *fibromodulin*, *COL2A1* and *COL6A3*. Here *cyclin B2* was again elevated.

Hypertrophic zone

The onset of hypertrophy in section C was accompanied by the strongest but transient expression of *VEGF* as well as *aggrecan* and *HAS-2*. *COL2A1* expression was maintained but that of *COL6A3* was not detected in this zone. In section C *MMP-13* continued to rise with *MMP-14*, *MMP-3*, *MMP-2* (latter only expressed here) and *MMP-9*. *ADAMTS-4* and *ADAMTS-5* were strongly expressed with *cathepsin K*. The inhibitors *TIMP-3* and *PAI-1* were markedly increased here.

In section B the proteinases continued to be expressed (except *MMP-2* which was only expressed in section C) but less so in the case of the aggrecanases. The inhibitors were also expressed but *PAI-1* expression was reduced.

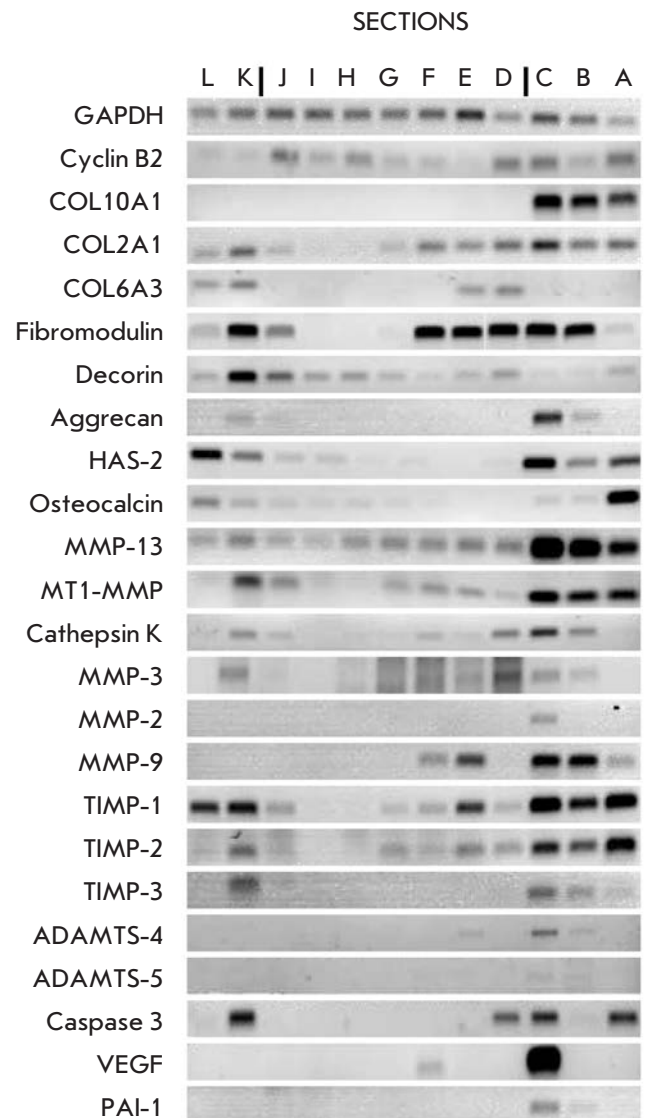


Fig. 2. A representative RT-PCR analyses of gene expression in the zones of the growth plate

The late hypertrophic zone of bovine growth plate is represented by section A. The gene expression analysis of this section revealed the highest expression of *cyclin B2*, *caspase 3*, *COL10A1*, *COL2A1*, *HAS-2* and *osteocalcin*. Collagenases *MMP-13* and *MMP-14* were also maximally expressed but *MMP-2*, *MMP-3*, *cathepsin K* and *ADAMTS-4* and *-5* were not expressed. *MMP-9* was weakly expressed. *Aggrecan* and *fibromodulin* expression was absent and weak, respectively. *TIMPs-1* and *-2* were further elevated, *TIMP-3* unchanged and *PAI-1* was absent.

The microanalytical methodology, involving RT-PCR analyses of sequential transverse sections of the primary proximal tibial growth plate, used in this and

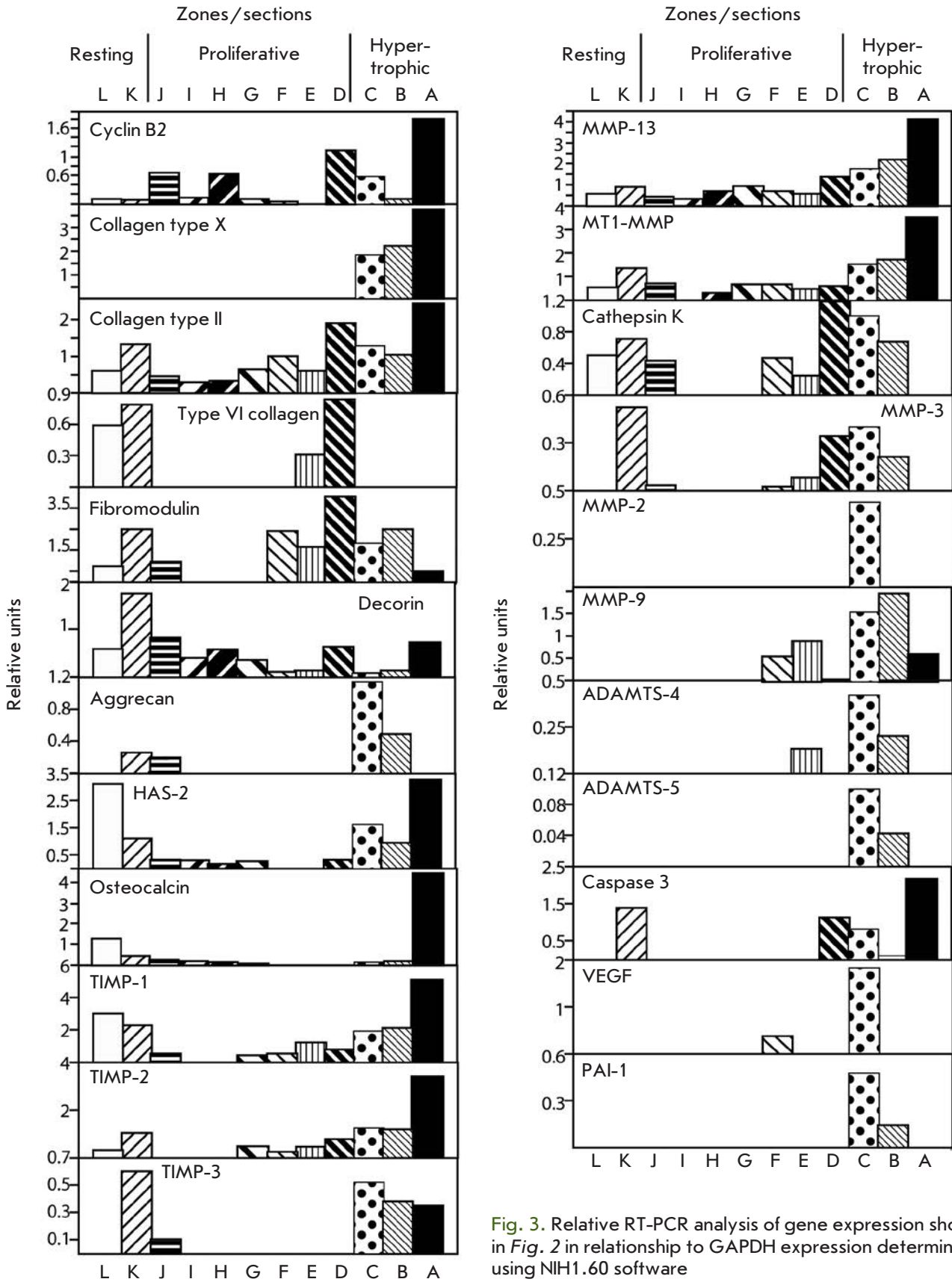


Fig. 3. Relative RT-PCR analysis of gene expression shown in Fig. 2 in relationship to GAPDH expression determined using NIH1.60 software

our previous study [17] permits expression analyses of the interrelationships of genes that have usually been studied individually concerning their participation in chondrocyte differentiation, matrix assembly and remodeling in the growth plate.

From our present studies, combined with our earlier analyses, we can observe that each of the principal zones of the growth plate is characterized by a distinct signature profile of gene expression. Thus the resting zone (sections L and K) is characterized by the expression of matrix molecules that include the collagen fibrillar network of *COL2A1* and the associated proteoglycans *fibromodulin* and *decorin*, the filamentous collagenous network of *COL6A3*, the aggrecan network with *HAS-2* representing the synthesis of hyaluronan, a key component of aggregating proteoglycans. There is even a low level of expression of osteocalcin better known as a protein expressed by osteoblasts and terminally hypertrophic chondrocytes [19]. This matrix expression is associated with expression of *caspase 3* for reasons that are unclear. Moreover, a low expression level of the proteinases *MMP-3*, *-13*, *-14* is also seen, accompanied by expression of all three *TIMPs*. Although *MMPs* are regulated both at gene expression and protein level, the correspondent local increase of collagenase dependent collagen cleavage activity at (next to) this area of the growth plate has been also observed by us earlier [8]. This expression of matrix degradation genes is associated with expression of *caspase 3*, indicating the cell apoptosis which accompanies chondrocyte proliferation in animal growth plate [20]. However at this time matrix assembly dominates but is accompanied by limited matrix remodelling as was suggested by our previous direct analyses of matrix collagen and proteoglycan in this growth plate [8]. The increased expression of *cathepsin K* in this zone raises questions as to whether this is related to either extracellular and /or intracellular activity of this proteinase. At this stage it is worthy of note that *ADAMTS-4* and *-5* are not expressed until the hypertrophic zone and that evidence for their involvement in aggrecan degradation is not seen until hypertrophy is observed. Upregulation of matrix remodeling genes in the area adjacent to the beginning of chondrocyte proliferative activity is associated with the strong upregulation of proliferative zone related growth factors, namely *FGF-2*, *TGFβ2* and *PTHrP* [17] indicating their involvement in the regulation of matrix turnover.

The upper proliferating growth plate chondrocytes, delineated by the increased expression of *cyclin B2*, which is first observed in section J and then H. These early proliferative chondrocytes did not show any significant changes in relative expression of genes involved in matrix remodeling.

The downregulation of *cyclin B2* expression in section E, preceding hypertrophy and is associated with another expression maximum of matrix remodeling. In contrast to resting zone, at this time the upregulation of matrix proteins *COL2A1*, *COL6A3* and *fibromodulin* is not accompanied by significant increase in *decorin*, *aggrecan* and *HAS-2* expression. However, as in the resting zone, expression of matrix degrading genes *MMPs* and *ADAMTS-4* and their inhibitors *TIMPs* was detected. *Fibromodulin* has been shown to be strongly expressed only in the proliferative zone in the rat and mouse growth plates [6, 21]. In contrast previous studies using sequential transverse sections (200–400 μm) of bovine growth plate revealed the presence of *fibromodulin* message in all the zones except the lower hypertrophic [22]. Our analyses reveal a 300μm region of the proliferating zone lacking significant expression of this protein. This study has also revealed that the distribution of *fibromodulin* expression in bovine growth plate is similar to that of *type II collagen* as was seen in mouse growth plate [23].

The gene expression of another collagen binding proteoglycan *decorin* progressively decreases in the proliferative zone confirming earlier data [21, 22]. This may be related to the ability of decorin to inhibit bone mineralization [23] which we know starts in section H in proliferating bovine growth plate chondrocytes [8]. *Decorin* expression is clearly greatest in the resting zone and decreases prior to hypertrophy.

In general the gene expression pattern in section D immediately preceding the hypertrophic zone is similar to that immediately preceding the onset of proliferation (section K) characterized by the expression of *COL2A1*, *COL6A3*, *fibromodulin*, *decorin*, *MMP-13*, *MMP-14*, *cathepsin K*, *MMP-3*, *TIMPs -1*, *-2* and *caspase 3* expression. However, at this time there is no *aggrecan*, little *HAS-2* expression and *TIMP-3* expression is also lacking. In spite of the similarity in gene expression pattern in sections K and D including that of *caspase 3*, the further fate of both groups of growth plate chondrocytes is not the same. Instead of chondrocyte progression to proliferation it is now to hypertrophy and is accompanied by the expression of different regulatory growth factors: namely *PTHrP* and *FGF-2* at the onset of proliferation, and *TGFβ1* and *Ihh* in the hypertrophic zone [17].

Immediately prior to hypertrophy there are some clear-cut changes in expression. *COL6A3* transiently peaks again as does *fibromodulin*. *Type II collagen* expression is also upregulated at this time. As we mentioned previously [17], *COL2A1* expression was detected throughout the growth plate. But when PCR was performed using equally diluted samples, three peaks of *COL2A1* expression were observed in samples K, D,

and A. The highest level of *type II collagen* expression in the lower proliferative and upper hypertrophic zones was also observed by others [24]. *MMP-9* is upregulated for the first time as is *ADAMTS-4*, although both transiently at this stage. *Cathepsin K* and *caspase 3* both rise again. The upregulation of the expression of these two genes in the proliferative and early hypertrophic chondrocytes were also observed in rodent and human growth plates [20, 25]. Clearly these changes reflect the cessation of proliferation and the beginning of hypertrophy.

The onset of hypertrophy is characterized by the sudden expression of *COL10A1*. This another gene expression maximum is characterized by the upregulation of *COL2A1*, *fibromodulin*, *aggrecan* and *HAS-2* expression and downregulation of *COL6A3*. The active process of ECM remodeling involving type II collagen loss mediated by collagenase [8] is accompanied by the upregulation of all the collagenases, gelatinases (*MMP-2* and *MMP-9*), *MMP-3*, *TIMPs* and expression of the aggrecanases *ADAMTS-4* and *-5*.

Growth plate vascularization is associated with the early transient hypertrophic upregulation of *VEGF* and persistent upregulation of *MMP-9* expression as observed by others [26, 27]. *MMP-9* expression clearly accompanies the expression of *VEGF* which is a chemoattractant and a mitogen for endothelial cells [28]. Active blood vessels ingrowth in the hypertrophic zone of the growth plate may account for upregulation of *cyclin B2* expression also seen in section D, C and A.

The final maximum of gene expression in section A is associated with the strong upregulation of collagenases *MMP-13* and *MMP-14*, the loss of expression of *cathepsin K*, and *ADAMTS-4* and *-5* and the maintenance or an increase in expression of the MMP inhibitors *TIMP-1*, *TIMP-2* and *TIMP-3* is accompanied by an increase of expression *COL2A1*, *decorin* and *HAS-2*. No expression of *aggrecan* or *type VI collagen* is detected at that time but *osteocalcin* is again expressed. The downregulation of *fibromodulin* expression seen here in the late hypertrophic zone has previously been established [21, 22].

Overall, by using the enlarged bovine physis our study provides an original insight into the interrelationships of gene expression in chondrocyte proliferation and differentiation associated with extracellular matrix assembly, mineralization, and vascularization. Our approach is the first sequential presentation of various genes in one study that permits an analysis of individual gene expression changes associated both with respect to their alterations in the continuum of chondrocyte differentiation ending in cell death through the growth plate. It also allows for a comparison of the expression of various genes in each individual 100 μm zone of the bovine physis.

In this respect upregulation of a gene in a distinct zone of the growth plate indicates its involvement in the processes associated with exact phase of chondrocyte differentiation. In contrast, downregulation of the gene indicates that its function is less important in that zone of the growth plate. In view of this the previously observed biphasic character of *MMP-13* expression in rodent growth plate [29] was supplemented by our original observation that that is not a case for *MMP-9* and *-2*, expressions of which were associated only with pre-hypertrophic and hypertrophic phases of chondrocyte differentiation. This further indicates the importance of collagenases *MMP-13*, *MT1-MMP*, *MMP-3*, and *cathepsin K* in extracellular matrix remodeling associated with further synthesis of chondrocyte-specific matrix supported by upregulation of extracellular matrix-related molecule expression here and in the following proliferative zone of the growth plate. In contrast, upregulation of *MMP-9*, *-2*, and both *aggrecanases* associated only with chondrocyte hypertrophy indicates their destructive activity in respect to chondrocyte-specific matrix. Moreover, the observed differences in matrix degrading molecule expression might be related also to differences in regulation of their expression as we previously reported [17] and differential growth factor profiles associated with early proliferative and hypertrophic zones in the bovine growth plate.

It is worth noting that early upregulation of genes involved in mineralization in the midst of proliferation zone in bovine growth plate observed in our previous studies [8] is also associated with upregulation of the genes related to extracellular matrix-related molecule expression, their inhibitors and vascularization markers: overt mineralization occurs later in the hypertrophic zone. This suggests that any alteration in chondrocyte metabolic activity is associated with specific extracellular matrix remodeling, which affects its properties and subsequent bone formation.

Therefore, our results indicating fluctuations in gene expression for extracellular matrix molecules, proteinases and their inhibitors in the bovine growth plate were expected. However, the exact profile of each gene pattern could not be predicted with accuracy prior to completion of this study.

CONCLUSIONS

The data presented here further define the complex changes and interrelationships in gene expression in the physis of the growth plate that occur in the course of chondrocyte maturation associated with matrix assembly, remodeling, cell proliferation, differentiation, vascular invasion and cell death. This investigation draws attention to distinct phases of expression of matrix molecules, proteinases and their inhibitors

and their relationships to the physiological events and regulatory molecules that are part of endochondral ossification. ●

This study was funded by Shriners Hospitals for Children and Canadian Institutes of Health (to A.R. Poole).

REFERENCES

1. Mackie E.J., Tatarczuch L., Mirams M. // *J. Endocrinol.* 2011. V. 211. P. 109–121.
2. Alini M., Matsui Y., Dodge G.R., Poole A.R. // *Calcified Tissue International.* 1992. V. 50. № 4. P. 327–335.
3. Poole A.R. // *Cartilage in Health and Disease* / Ed. Koopman W. *Arthritis and Allied Conditions.* 15th ed. Chapter 11. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2005. P. 223–269.
4. Svensson L., Oldberg A., Heinegard D. // *Osteoarthritis&Cartilage.* 2001. V. 9. Suppl A. S23–S28.
5. Damron T.A., Zhang M., Pritchard M.R., Middleton F.A., Horton J.A., Margulies B.M., Strauss J.A., Farnum C.E., Spadaro J.A. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. V. 74. P. 949–956.
6. Simsa S., Hasdai A., Dan H., Ornan E.M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 292. P. R2216–2224.
7. Armstrong A.L., Barrach H.J., Ehrlich M.G. // *J. Orthop. Res.* 2002. V. 20. № 2. P. 289–294.
8. Mwale F., Tchetina E., Wu W., Poole A.R. // *J. Bone Miner. Res.* V. 17. № 2. P. 275–283.
9. Wu W., Tchetina E., Mwale F., Hasty K., Pidoux I., Reiner A., Chen J., van Wart H.E., Poole A.R. // *J. Bone Miner. Res.* 2002. V. 17. P. 639–651.
10. Mitani H., Takahashi I., Onodera K., Bae J.W., Sato T., Takahashi N., Sasano Y., Igarashi K., Mitani H. // *Histochem. Cell Biol.* 2006. V. 126. P. 371–380.
11. Kielty C.M., Lees M., Shuttleworth C.A., Woolley D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 191. № 3. P. 1230–1236.
12. Myint E., Brown D.J., Ljubimov A.V., Kyaw M., Kenney M.C. // *Cornea.* 1996. V. 15. № 5. P. 490–496.
13. Joronen K., Salminen H., Glumoff V., Savontaus M., Vuorio E. *Histochem. // Cell Biol.* 2000. V. 114. № 2. P. 157–165.
14. Kahari V.M., Saarialho-Kere U. // 1999. *Ann. Med.* V. 31. № 1. P. 34–45.
15. Bertaux B., Hornebeck W., Eisen A.Z., Dubertret L. // 1991. *J. Invest. Dermatol.* V. 97. № 4. P. 679–685.
16. Wick M., Burger C., Brusselbach S., Lucibello F.C., Muller R. // 1994. *J. Biol. Chem.* V. 269. № 29. P. 18953–18960.
17. Tchetina E., Mwale F., Poole A.R. // 2003. *J. Bone Miner. Res.* V. 5. № 5. P. 844–851.
18. Pal S., Tang L.H., Choi H., Haberman L.C., Ruoghley P.J., Poole A.R. // 1981. *Collagen Relat. Res.* V. 1 P. 151–176.
19. Pullig O., Weseloh G., Ronneberger D.-L., Kakonen S.M., Swoboda B. // 2000. *Calcif. Tissue Int.* V. 67. № 3. P. 230–240.
20. Chrysis D., Nilsson O., Ritzen E.M., Savendahl L. // 2002. *Endocrine.* V. 18. № 3. P. 271–278.
21. Wang Y., Middleton F., Horton J.A., Reichel L., Farnum C.E., Damron T.A. // 2004. *Bone.* V. 35. № 6. P. 1273–1293.
22. Alini M., Roughley P. // 2001. *Matrix Biol.* V. 19. № 8. P. 805–813.
23. Hoshi K., Kemmotsu S., Takeuchi Y., Amizuka N., Ozawa H. // 1999. *J. Bone Miner. Res.* V. 14. № 2. P. 273–280.
24. O’Keefe R.J., Puzas J.E., Loveys L., Hicks D.G., Rosier R.N. // 1994. *J. Bone Miner. Res.* V. 9, № 11. P. 1713–1722.
25. Soderstrom M., Salminen H., Glumoff V., Kirschke H., Aro H., Vuorio E. // 1999. *Biochim. Biophys. Acta.* V.1446. № 1–2. P. 35–46.
26. Garcia-Ramirez M., Toran N., Andaluz P., Carrascosa A., Audi L. // 2000. *J. Bone Miner. Res.* V. 15. P. 534–540.
27. Takahara M., Naruse T., Takagi M., Orui H., Ogino T. // 2004. *J. Orthop. Res.* V. 22. № 5. P. 1050–1057.
28. Yang Y.Q., Tan Y.Y., Wong R., Wenden A., Zhang L.K., Rabie A.B. // 2012. *Int. J. Oral. Sci.* V. 4. P. 64–68.
29. Alvarez J., Balbin M., Santos F., Fernandez M., Ferrando M., Lopez J.M. // 2000. *J. Bone Miner. Res.* V. 15. P. 82–94.

УДК 615.214; 591.35

Влияние неонатального введения флувоксамина на физическое развитие и активность серотонинергической системы белых крыс

Н. Ю. Глазова¹, С. А. Мерчиева², М. А. Володина², Е. А. Себенцова¹, Д. М. Манченко², В. С. Кудрин³, Н. Г. Левицкая^{1*}

¹Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: nglevitskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2014

РЕФЕРАТ Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), в том числе флувоксамин (ФА), широко используются для лечения депрессивных расстройств у беременных женщин. Антидепрессанты этой группы хорошо проникают через плацентарный барьер, и плод подвергается воздействию SSRI во время критической фазы неонатального развития. Ряд клинических исследований свидетельствует о том, что пренатальное воздействие SSRI приводит к увеличению неонатальной смертности и числа преждевременных родов, снижению веса новорожденных и задержке психомоторного развития. Однако эффекты пренатального воздействия SSRI недостаточно исследованы. Моделью для изучения эффектов пренатального влияния SSRI является неонатальное введение этих препаратов в течение первых недель жизни грызунов. Цель работ состояла в изучении острых эффектов хронического введения ФА детенышам белых крыс. Работа выполнена на крысятах обоего пола. ФА вводили внутривентрикулярно (10 мг/кг/день) с 1-го по 14-й постнатальные дни. Регистрировали уровень летальности, массу тела, возраст открытия глаз и время становления моторных рефлексов. Также определяли содержание биогенных аминов и их метаболитов в структурах головного мозга. Показано, что неонатальное введение ФА приводит к увеличению уровня летальности, снижению массы тела и замедляет становление моторных рефлексов. Кроме того, у животных, получавших ФА, зарегистрировано увеличение содержания норадреналина в гипоталамусе, серотонина в гиппокампе и метаболита серотонина 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) во фронтальной коре, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме по сравнению с контролем. Можно заключить, что изменения активности серотонинергической системы, вызванные введением ФА на ранних этапах развития, приводят к задержке физического и моторного развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биогенные амины, неонатальное введение, психомоторное развитие, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, флувоксамин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГVK – гомованилиновая кислота; 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; ДА – дофамин; ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота; ИК – интактный контроль; НА – норадреналин; 5-ОТ – серотонин; ПНД – постнатальный день; ФА – флувоксамин; SERT – транспортер серотонина; SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина.

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия – широко распространенное психическое заболевание, которым страдают более 10% населения. Женщины подвержены депрессии намного больше, чем мужчины. Депрессивные симптомы регистрируются у 14–23% женщин в период беременности [1]. В последние годы препаратами первой очереди

при депрессивных расстройствах являются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), и использование этих препаратов постоянно увеличивается. К препаратам этой группы относятся флуоксетин, циталопрам, флувоксамин (ФА), пароксетин, сертралин и др. Все SSRI действуют по аналогично-

му механизму, несмотря на различия в химической структуре [2]. Мишенью действия SSRI является транспортер серотонина (SERT), отвечающий за обратный захват медиатора из синаптической щели. Блокада SERT приводит к возрастанию серотонинергической нейротрансмиссии. Антидепрессанты группы SSRI используются при депрессивных расстройствах у беременных и кормящих женщин. В настоящее время согласно различным источникам от 6 до 13% женщин в период беременности принимают SSRI [3, 4]. При этом возрастают длительность приема и суточные дозы назначаемых препаратов [5]. SSRI хорошо проникают через плацентарный барьер и регистрируются в амниотической жидкости, пуповинной крови и плазме плода [6]. Содержание различных антидепрессантов этой группы в пуповинной крови составляет от 70 до 86% от его содержания в крови матери, следовательно, плод подвергается воздействию физиологически активных доз SSRI [7]. Однако последствия воздействия SSRI на развивающийся организм до настоящего времени недостаточно изучены. Результаты клинических исследований крайне противоречивы. В некоторых работах не зарегистрировано влияния препаратов на течение беременности и состояние новорожденных [8–10]. По другим данным, SSRI негативно влияют на исход беременности: отмечается увеличение числа спонтанных выкидышей и неонатальной смертности, возрастание риска преждевременных родов, снижение веса новорожденных [1, 3, 11]. У 15–30% новорожденных, подвергавшихся пренатально воздействию SSRI, нарушена неонатальная адаптация (неонатальный синдром отмены). В первые дни жизни у детей наблюдаются нарушения дыхания, гипогликемия, нестабильная температура тела, нарушения сна, повышенная возбудимость и судороги. Указанные симптомы исчезают в течение 1–2 недель [1, 7]. Кроме того, воздействие SSRI в период беременности (особенно последнего триместра) приводит к снижению у новорожденных балла по шкале Апгар, задержке психомоторного развития, нарушениям сна, персистирующей легочной гипертензии, нарушениям сердечно-сосудистой системы [2, 3, 6, 12, 13]. Все перечисленные эффекты отмечаются в ранний неонатальный период (от рождения до 6 мес.). Сведения об отставленных эффектах пренатального воздействия SSRI ограничены, что связано с длительностью и сложностью проведения таких исследований [13, 14]. Как уже указывалось, результаты клинических исследований последствий пренатального воздействия SSRI достаточно противоречивы. Причиной этого может быть большая неоднородность выборки беременных женщин, на которой проводилось исследование. В одну группу включаются женщины с раз-

ной тяжестью депрессии, принимавшие разные препараты группы SSRI в разные сроки беременности и в разных дозах [11].

Последствия воздействия препаратов группы SSRI на развивающийся мозг активно изучают в опытах на животных, главным образом на грызунах. Периодом развития ЦНС человека, наиболее чувствительным к действию SSRI, является третий триместр беременности [12]. Хотя сложно провести корректное сравнение развития мозга человека и грызунов, данные по созреванию ЦНС (в том числе серотонинергической системы) позволяют сопоставить последний триместр беременности у человека с первыми неделями жизни крыс [15, 16]. Поэтому воздействие SSRI в течение первых недель жизни крыс можно рассматривать как модель для изучения эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы в течение третьего триместра беременности у человека [17]. Экспериментально показано, что хроническое введение SSRI в неонатальный период вызывает долговременные изменения поведения животных. У взрослых крыс и мышей, которым в первые недели жизни вводили SSRI, наблюдались увеличение тревожности и депрессивности, нарушения пищевого поведения, изменение активности серотонинергической системы [17, 18].

Таким образом, клинические исследования последствий пренатального воздействия препаратов группы SSRI в основном сфокусированы на неонатальных нарушениях, а сведения об отставленных эффектах таких воздействий ограничены. Напротив, эксперименты на животных связаны, главным образом, с оценкой долговременных последствий перинатального введения SSRI [15], исследования неонатальных эффектов немногочисленны [4, 19, 20]. Однако изучение острых эффектов неонатального введения SSRI животным необходимо для доказательства адекватности используемых экспериментальных моделей.

Флувоксамин (*Fluvoxamine*) – современный антидепрессант из группы SSRI. По фармакологическим свойствам флувоксамин близок к флуоксетину, но отличается высокой эффективностью и селективностью [21] и оказывает анксиолитическое действие. Эффекты неонатального введения ФА ранее не изучали. В представленной работе исследовано влияние хронического неонатального введения флувоксамина на физическое развитие и состояние серотонинергической системы у детенышей белых крыс.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнена на детенышах нелинейных белых крыс обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-часового светового режима.

День рождения крысят принимали за нулевой постнатальный день (ПНД). Было проведено две серии опытов.

В первой серии использовали 10 выводков, крысят каждого выводка делили на три группы – интактный контроль («ИК»), контроль («КОН») и флувоксамин («ФА»). Группа «ИК» была необходима для оценки влияния ежедневных экспериментальных манипуляций на регистрируемые нами параметры. Так как в первой серии не обнаружено отличий между группами «ИК» и «КОН», во второй серии опытов также использовали 10 выводков, но для сокращения количества животных каждый выводок делили на две группы – «КОН» и «ФА». Крысы группы «ИК» с 1 по 14 ПНД подвергались ежедневному хэндлингу без введения препаратов. Животным группы «КОН» с 1 по 14 ПНД ежедневно внутрибрюшинно (в/б) вводили воду для инъекций в объеме 2 мл/кг веса. Крысы группы «ФА» с 1 по 14 ПНД ежедневно получали в/б инъекции флувоксамина (флувоксамин малеат, фирма Sigma) в дозе 10 мг/кг веса.

Для оценки физического развития крысят регистрировали возраст открытия глаз и массу тела животных. Уровень психомоторного развития оценивали в тестах «рефлекс переворота», «рефлекс ползания» и «рефлекс отрицательного геотаксиса». «Рефлекс переворота» – крысенок в возрасте 6 дней кладут на спину и засекают время, за которое животное перевернется на все четыре лапы. «Рефлекс ползания» – крысенок в возрасте 10 дней помещают в центр окружности диаметром 13 см, регистрируют время, за которое животное выползает за пределы окружности. «Рефлекс отрицательного геотаксиса» – крысенок в возрасте 12 дней помещают на наклонную поверхность (45°) длиной 30 см головой в направлении склона, регистрируют время, за которое животное поворачивается на 180° [19, 20].

С целью изучения влияния неонатального введения ФА на содержание биогенных аминов и их метаболитов в головном мозге крыс часть животных в возрасте 16 ПНД (через 48 ч после последней инъекции) декапитировали. У животных извлекали мозг и выделяли следующие отделы: фронтальная кора, гипоталамус, гиппокамп и стриатум. Образцы быстро замораживали в жидком азоте и в дальнейшем хранили при -70°C. Ткани мозга гомогенизировали. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание биогенных аминов и их метаболитов – норадреналин (НА), серотонин (5-ОТ), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-ГИУК), дофамин (ДА), гомованилиновая кислота (ГВК) и 3,4-диоксифенилуксусная кислота (ДОФУК).

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Результаты обрабатывали с использованием пакета программ Statistica. Уровень летальности в группах сравнивали с помощью теста «отличие двух пропорций». При оценке изменений массы тела использовали двухфакторный метод ANOVA для повторных измерений (факторы пол и группа). Возраст открытия глаз и психомоторное развитие крысят сравнивали с помощью двухфакторного метода ANOVA (факторы пол и группа), отличия между группами оценивали с использованием LSD-теста. Содержание биогенных аминов мозга анализировали с использованием двухфакторного метода ANOVA (факторы пол-группа или выводок-группа). Сравнение групповых средних для нормированных значений содержания биогенных аминов проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Данные на рисунках представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на животных обоего пола. Применение двухфакторного метода ANOVA (фактор 1 – группа; фактор 2 – пол) не выявило значимого влияния пола и взаимодействия между факторами во всех использованных нами тестах, что позволило нам представить результаты, полученные на всей группе крыс.

В ходе эксперимента оценивали уровень летальности в группах животных. В группе «ИК» к 16 ПНД выжило 100% крыс, в группе «КОН» – 95.1%, а в группе «ФА» – 85.5% (рис. 1). Ежедневные внутрибрюшинные

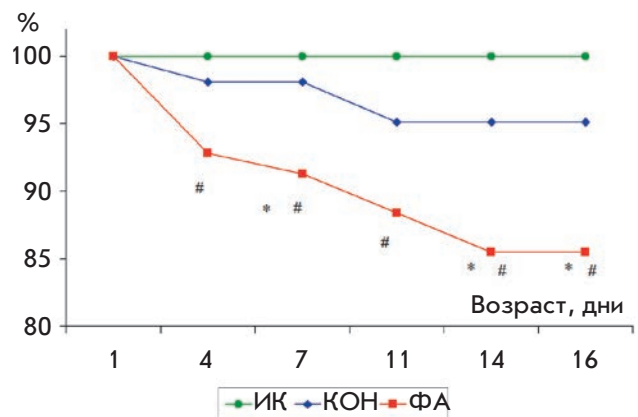


Рис. 1. Влияние неонатального введения флувоксамина на уровень летальности крыс. По оси X – возраст крыс, по оси Y – число выживших животных в процентах к исходному количеству крыс в группе («ИК» $n = 34$, «КОН» $n = 90$, «ФА» $n = 88$). Значимые отличия от контроля отмечены *, от группы «ИК» – # ($p < 0.05$, тест «отличие двух пропорций»)

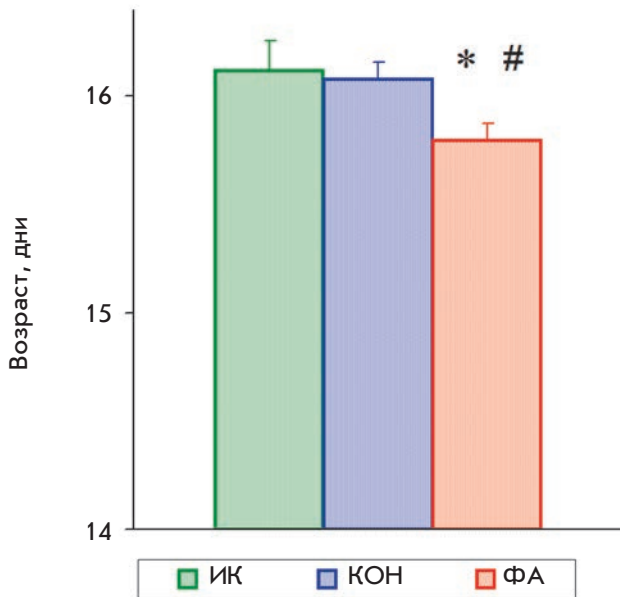


Рис. 2. Влияние неонатального введения флувоксамина на возраст открытия глаз («ИК» $n = 33$, «КОН» $n = 86$, «ФА» $n = 75$). Значимые отличия от контроля отмечены *, от группы «ИК» – # ($p < 0.05$, LSD-тест)

инъекции растворителя приводили к увеличению летальности в этой группе крыс, однако статистически значимых отличий от интактного контроля не обнаружено ($p > 0.20$). Хроническое неонатальное введение ФА приводило к значимому увеличению уровня летальности по сравнению с контролем ($p < 0.03$).

Показано, что на возраст открытия глаз у крысят, которым неонатально вводили флувоксамин, фактор пол не влияет статистически значимо ($F_{1,193} = 2.73$, $p > 0.10$), в отличие от фактора группа ($F_{2,193} = 3.57$, $p < 0.03$). Дальнейший анализ показал, что в группе «ФА» наблюдается незначительное, но статистически значимое снижение возраста открытия глаз относительно групп «ИК» и «КОН» (рис. 2). В группе крыс, получавших ФА, к 16-му дню жизни глаза были открыты у 86.3% животных, в то время как в контроле и в группе «ИК» этот показатель составил 70.7 и 67.6% соответственно ($p < 0.03$).

Измерение массы тела выявило статистически значимые отличия между новорожденными крысятами из контрольных групп в первой и второй сериях опытов (6.14 ± 0.13 и 6.50 ± 0.08 г, $p < 0.01$), исходных отличий между группами «ФА» и «ИК» и соответствующими им контрольными группами не обнаружено. На рис. 3 представлено изменение массы тела

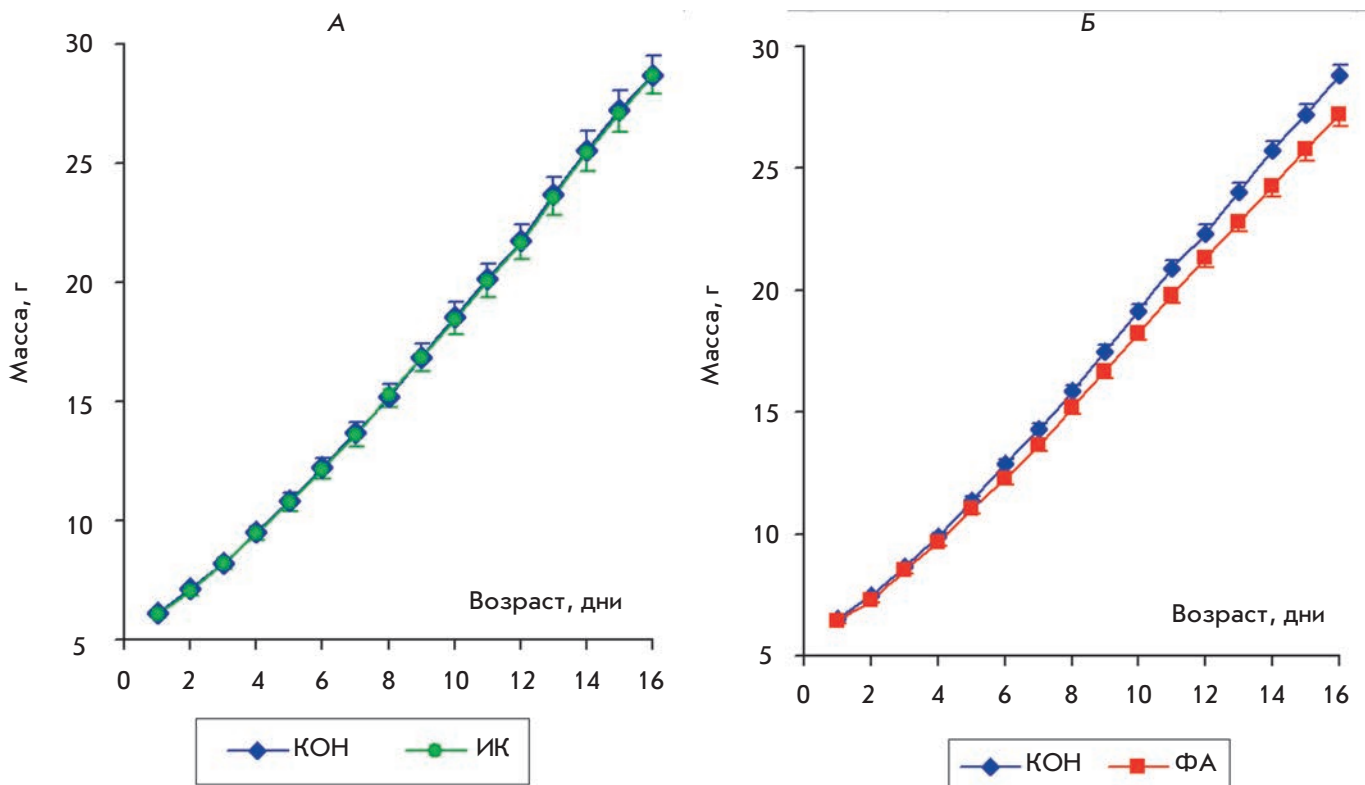


Рис. 3. Влияние неонатального введения флувоксамина на изменение массы тела крыс. По оси X – возраст крыс, по оси Y – масса тела (А – «ИК» $n = 33$, «КОН» $n = 33$; Б – «КОН» $n = 86$, «ФА» $n = 75$)

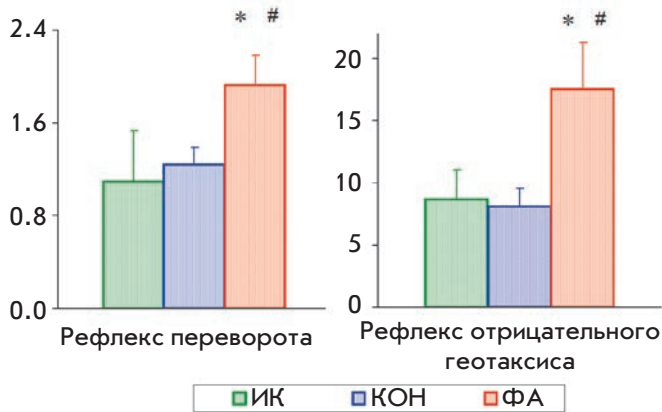


Рис. 4. Влияние неонатального введения флувоксамина на время выполнения реакции в тестах «рефлекс переворота» (6 ПНД; «ИК» $n = 16$, «КОН» $n = 30$, «ФА» $n = 28$) и «рефлекс отрицательного геотаксиса» (10 ПНД; «ИК» $n = 13$, «КОН» $n = 14$, «ФА» $n = 14$). Значимые отличия от контроля отмечены *, от группы «ИК» – # ($p < 0.05$, LSD-тест)

крыс в группах «ФА» и «ИК» по сравнению с соответствующими контрольными группами. Во всех экспериментальных группах масса тела возрастала с 1-го по 16 ПНД ($F_{15,2325} = 4058.8$; $p < 0.001$ и $F_{15,930} = 1557$; $p < 0.001$, рис. 3А и 3Б соответственно). Фактор пол не влиял статистически значимо на массу тела крыс в первой и второй сериях опытов ($F_{1,62} = 0.70$; $p > 0.40$

и $F_{1,155} = 0.10$; $p > 0.80$ соответственно). При сравнении групп «ИК» и «КОН» не выявлено значимого влияния фактора группа на изменение массы тела крыс ($F_{1,62} = 0.01$; $p < 0.98$). В случае групп «КОН» и «ФА» отмечено значимое влияние фактора группа на изменение массы тела ($F_{1,155} = 4.1$; $p < 0.04$). Следовательно, ежедневные внутривентральные инъекции растворителя не влияли на прирост массы тела, в то время как введение ФА замедляло рост животных.

Не обнаружено статистически значимого влияния фактора пол на становление двигательных рефлексов у крыс ($F_{1,68} = 0.17$; $p > 0.65$ в тесте «рефлекс переворота» и $F_{1,35} < 0.10$; $p > 0.80$ в тестах «рефлекс отрицательного геотаксиса» и «рефлекс ползания»). При этом фактор группа значимо влиял на время выполнения реакции в тестах «рефлекс переворота» ($F_{2,68} = 4.37$; $p < 0.04$) и «рефлекс отрицательного геотаксиса» ($F_{2,35} = 4.38$; $p < 0.05$), влияния на поведение крыс в тесте «рефлекс ползания» отмечено не было ($F_{2,35} = 0.67$; $p = 0.52$). Дальнейший анализ не выявил значимых отличий между группами «ИК» и «КОН». В группе «ФА» величина регистрируемых показателей была статистически значимо выше, чем в контроле и в группе «ИК» (рис. 4).

Измерение содержания биогенных аминов и их метаболитов в мозге крыс проводили на 16 ПНД. Результаты представлены в таблице. Мы не обнаружили значимого влияния пола на регистрируемые показатели ($F < 3.0$; $p > 0.10$). Для измерения использовали животных пяти выводов, в каждом

Содержание биогенных аминов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в различных отделах головного мозга

Биогенные амины и их метаболиты	Фронтальная кора				Гиппокамп				Гипоталамус				Стриатум			
	ИК	КОН	ФА	F (p)	ИК	КОН	ФА	F (p)	ИК	КОН	ФА	F (p)	ИК	КОН	ФА	F (p)
НА	0.40 ± 0.07	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.96 (0.39)	0.72 ± 0.11	0.76 ± 0.10	0.86 ± 0.12	0.56 (0.57)	3.10 ± 0.21	3.37 ± 0.10	3.63 ± 0.10	4.50 (0.02)	0.50 ± 0.14	0.67 ± 0.17	0.55 ± 0.14	0.48 (0.62)
ДА	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.03	2.26 (0.12)	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	1.93 (0.16)	0.96 ± 0.07	1.21 ± 0.10	1.09 ± 0.06	2.63 (0.09)	19.93 ± 0.63	19.72 ± 0.76	18.74 ± 0.70	1.02 (0.37)
ДОФУК	0.11 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.02	1.64 (0.21)	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	1.92 (0.16)	0.38 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.44 ± 0.04	0.74 (0.48)	3.46 ± 0.15	3.46 ± 0.16	3.31 ± 0.17	0.21 (0.81)
ГВК	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.04	0.10 ± 0.02	2.37 (0.12)	0.54 ± 0.17	0.75 ± 0.12	0.75 ± 0.16	0.65 (0.53)	0.37 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.60 (0.55)	2.49 ± 0.20	2.56 ± 0.13	2.68 ± 0.11	0.25 (0.78)
5-ОТ	1.16 ± 0.09	1.16 ± 0.05	1.19 ± 0.08	0.40 (0.67)	1.22 ± 0.06	1.23 ± 0.03	1.30 ± 0.04	1.33 (0.28)	2.47 ± 0.15	2.92 ± 0.11	3.04 ± 0.11	8.33 (0.001)	1.15 ± 0.06	1.27 ± 0.06	1.36 ± 0.09	1.09 (0.35)
5-ГИУК	0.44 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.47 ± 0.03	3.55 (0.04)	0.95 ± 0.07	0.96 ± 0.05	1.07 ± 0.06	4.36 (0.02)	1.49 ± 0.12	1.68 ± 0.09	1.89 ± 0.10	7.78 (0.002)	1.22 ± 0.08	1.32 ± 0.09	1.49 ± 0.09	12.13 (0.001)

из которых по три-четыре крысы из каждой группы. Применение двухфакторного метода ANOVA (фактор 1 – группа; фактор 2 – выводок) показало, что фактор группа статистически значимо влияет на следующие показатели – содержание 5-ГИУК в гиппокампе ($F_{2,38} = 4.36; p < 0.02$), фронтальной коре ($F_{2,36} = 3.55; p < 0.04$) и стриатуме ($F_{2,40} = 12.13; p < 0.001$), а также содержание НА, 5-ОТ и 5-ГИУК в гипоталамусе ($F_{2,40} > 4.5; p < 0.02$). Не зарегистрировано значимого влияния фактора группа на уровень ДА и его метаболитов во всех исследованных структурах ($F < 2.60; p > 0.10$). Кроме того, отмечено значимое влияние фактора выводок на большинство показателей ($F > 2.95; p < 0.05$), что свидетельствует о вариабельности показателей в разных выводках. При этом не наблюдалось значимого взаимодействия факторов группа и выводок ($F < 1.50; p > 0.20$). Чтобы исключить влияние фактора выводок значения параметров для каждого выводка нормировали к собственному контролю. Дальнейший анализ не выявил статистически значимых отличий в содержании биогенных аминов и их метаболитов в исследованных структурах мозга между группами «ИК» и «КОН». В группе «ФА» отмечено значимое увеличение содержания НА в гипоталамусе, 5-ОТ в гиппокампе и 5-ГИУК во всех структурах относительно контроля (рис. 5). Соотношение 5-ГИУК/5-ОТ в группе «ФА» во всех структурах значимо превышало значения в группе «КОН». В группе крыс, получавших ФА, зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания 5-ОТ в гиппокампе и гипоталамусе, НА в гипоталамусе и 5-ГИУК в гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме, а также возрастание соотношения 5-ГИУК/5-ОТ в гиппокампе по сравнению с интактным контролем. Кроме того, наблюдалась тенденция к увеличению уровня 5-ГИУК во фронтальной коре и соотношения 5-ГИУК/5-ОТ в гипоталамусе и стриатуме относительно интактного контроля ($p < 0.10$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление результатов, полученных в группах интактный контроль и контроль, позволяет заключить, что ежедневные в/б инъекции растворителя в течение первых 14 дней жизни не приводят к статистически значимому увеличению уровня летальности, а также не вызывают значимых изменений скорости соматического роста, времени открытия глаз и становления моторных рефлексов, т.е. не влияют на физическое и сенсомоторное развитие животных. Кроме того, ежедневные инъекции растворителя не оказывают воздействия на состояние системы биогенных аминов мозга крыс в возрасте 16 дней. Следовательно, использованные экспериментальные манипуляции не приводят к значимым изменениям

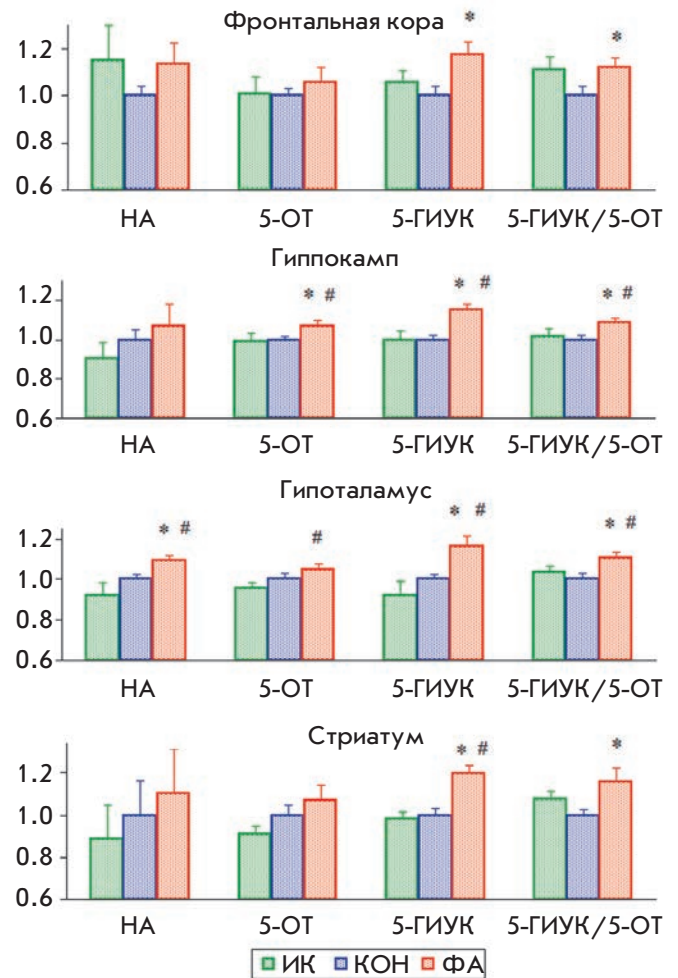


Рис. 5. Влияние неонатального введения флувоксамина на содержание норадреналина, серотонина и его метаболита 5-ГИУК в различных отделах мозга. По оси Y – величина показателя, нормированная по контролю («ИК» $n = 18$, «КОН» $n = 19$, «ФА» $n = 18$). Значимые отличия от контроля отмечены *, от группы «ИК» – # ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни)

физиологических и нейрохимических показателей, регистрируемых в данной работе.

В группе крыс, получавших ежедневные инъекции ФА, отмечено значимое увеличение уровня летальности по сравнению с контрольными группами животных. Кроме того, у животных группы «ФА» наблюдается замедление набора веса. Негативное влияние неонатального введения препаратов группы SSRI на изменение массы тела животных зарегистрировано в ряде исследований. Так, к замедлению роста животных приводит введение в ранний период развития крыс циталопрама [20], сертралина [19, 22] и флуоксетина [18]. Известно, что серотонинергиче-

ская система играет важную роль в регуляции аппетита и потребления пищи. Препараты, увеличивающие внеклеточное содержание 5-ОТ, проявляют выраженную анорексигенную активность [23], поэтому нельзя исключить, что влияние SSRI на изменение массы тела связано с анорексигенными эффектами 5-ОТ. Однако также показано, что неонатальное введение SSRI приводит к развитию гиперметаболического состояния у мышей [22]. Повышение уровня метаболизма у животных, получавших ФА, также может быть причиной замедления набора веса.

Нами показано также, что у крысят, получавших инъекции флувоксамина, глаза открывались в более раннем возрасте, чем у контрольных животных. Известно, что во время активного развития нервной системы моноамины играют роль трофических факторов. В пренатальный и ранний постнатальный период серотонин является сигнальным фактором в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки в нервной ткани, а также влияет на развитие эпителиальной ткани [15, 24]. Показано, что неонатальное введение 5-гидрокситриптофана, предшественника серотонина, приводит к более раннему открытию глаз [25]. Можно предположить, что увеличение активности серотонинергической системы в этот период приводит к ускорению развития зрительного анализатора. Вероятно, именно с этим связано более раннее открытие глаз в группе крыс, получавших инъекции флувоксамина.

Нами зарегистрировано увеличение латентного периода выполнения рефлексивных поворотов и отрицательного геотаксиса в группе животных, получавших инъекции ФА, что свидетельствует о замедлении становления моторных рефлексивных функций. Замедление становления моторных рефлексивных функций наблюдали в работах Diego и соавт., которые показали более позднее становление рефлексивных функций у крыс, которым неонатально вводили сертралин [19] или циталопрам [20]. Следовательно, введение SSRI крысам в ранний постнатальный период приводит к нарушению развития моторных функций. Известно, что в период интенсивного развития мозга изменения содержания биогенных аминов, вызванные фармакологическими или стрессорными воздействиями, могут приводить к необратимым морфологическим и функциональным изменениям в ЦНС [26]. Так, неонатальное введение флуоксетина приводит к уменьшению числа и размеров 5-ОТ-нейронов в ядрах шва и количества 5-ОТ-терминалей в гиппокампе [27]. Увеличение содержания серотонина в мозге в период развития нарушает миелинизацию аксонов [28]. Неонатальное воздействие SSRI вызывает морфологические изменения нейронов стриатума и моторной коры – снижается длина и разветвленность дендритов и умень-

шается плотность дендритных шипиков [17]. Такие изменения могут приводить к задержке развития двигательных функций [28].

Проведенные нами эксперименты показали, что неонатальное введение ФА вызывает замедление соматического роста, снижение возраста открытия глаз и задержку становления моторных рефлексивных функций. Возраст открытия глаз и изменения массы тела отражают уровень физического развития животных, в то время как динамические тесты на выполнение моторных рефлексивных функций позволяют оценить созревание вестибулярной функции. Разнонаправленное влияние неонатальных воздействий на физическое и моторное развитие животных показано в ряде работ. Так, неонатальный стресс, вызванный долговременной материнской депривацией, приводил к снижению возраста открытия глаз и задержке становления моторных рефлексивных функций. При этом у животных увеличивалась активность серотонинергической системы [29]. Влияние неонатального введения ФА на возраст открытия глаз, вероятно, связано с его трофической функцией на ранних этапах онтогенеза, так как ускорение развития нервных и эпителиальных клеток может приводить к более раннему созреванию зрительного анализатора. Негативное влияние ФА на становление моторных рефлексивных функций может определяться морфологическими изменениями в ЦНС, вызванными неонатальным введением SSRI. Такие изменения приводят к нарушению формирования связей между структурами мозга, что может лежать в основе замедленного созревания двигательных функций [28].

В наших опытах уровень биогенных аминов и их метаболитов измеряли через 48 ч после последней инъекции ФА. Из всех препаратов группы SSRI у флувоксамина самая короткая длительность действия, время полужизни этого антидепрессанта составляет 15–17 ч, а его метаболиты не обладают физиологической активностью [30]. Следовательно, через 48 ч мы наблюдаем эффекты отмены этого препарата. Исследования, проведенные на взрослых животных, показали, что после прекращения хронического введения SSRI в различных отделах головного мозга крыс увеличивается содержание метаболита серотонина 5-ГИУК, возрастает соотношение 5-ГИУК/5-ОТ [30–32]. В зависимости от длительности действия препарата эффект развивается через 48–72 ч после последней инъекции и сохраняется до 2 недель [33]. Согласно полученным нами данным, прекращение введения ФА крысам в возрасте 14 дней также приводит к увеличению содержания 5-ГИУК и соотношения 5-ГИУК/5-ОТ в различных отделах мозга. Соотношение 5-ГИУК/5-ОТ служит показателем скорости оборота серотонина в мозге,

и повышение этого соотношения свидетельствует об увеличении активности 5-ОТ-системы.

Согласно клиническим данным, резкое прекращение приема препаратов группы SSRI вызывает синдром отмены, который включает такие симптомы, как психомоторное возбуждение, тревожность, нарушения сна, головокружение и др. Вероятный механизм этого синдрома – возрастание активности серотонинергической системы мозга [30]. У 15–30% новорожденных, получавших пренатально SSRI, отмечено нарушение неонатальной адаптации [1]. Большинство исследователей также связывают эти нарушения с прекращением действия препаратов [7, 11]. Можно предположить, что, как и у взрослых пациентов, неонатальный синдром отмены связан с увеличением активности 5-ОТ-системы после прекращения действия SSRI. Это предположение подтверждают полученные нами данные о повышении скорости оборота серотонина у животных после завершения курса неонатального введения флувоксамина.

Многочисленные клинические исследования свидетельствуют о том, что пренатальное воздействие препаратов группы SSRI (особенно в течение третьего триместра) негативно влияет на исход беременно-

сти и состояние новорожденных. Отмечается увеличение числа спонтанных выкидышей и неонатальной смертности, снижение веса новорожденных, а в дальнейшем нарушение неонатальной адаптации и задержка психомоторного развития [3, 11, 34]. В нашей работе показано, что хроническое введение селективного ингибитора обратного захвата серотонина – флувоксамина, детенышам белых крыс с 1-го по 14-й дни жизни приводит к увеличению уровня летальности, замедлению соматического роста и задержке моторного развития. Кроме того, в ответ на прекращение введения препарата наблюдается возрастание активности серотонинергической системы в различных отделах мозга. Полученные нами данные позволяют заключить, что введение SSRI детенышам крыс в течение первых недель жизни можно рассматривать как адекватную модель для изучения эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы у человека. ●

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (грант № 14-04-01913).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yonkers K.A., Wisner K.L., Stewart D.E., Oberlander T.F., Dell D.L., Stotland N., Ramin S., Chaudron L., Lockwood C. // *Gen. Hosp. Psychiatry*. 2009. V. 31. № 5. P. 403–413.
- Diav-Citrin O., Ornoy A. // *Obstet. Gynecol. Int.* 2012. V. 2012. ID 698947.
- Smith M.V., Sung A., Shah B., Mayes L., Klein D.S., Yonkers K.A. // *Early Hum. Dev.* 2013. V. 89. № 2. P. 81–86.
- Haskell S.E., Hermann G.M., Reinking B.E., Volk K.A., Peotta V.A., Zhu V., Roghair R.D. // *Pediatr. Res.* 2013. V. 73. № 3. P. 286–293.
- Tuccori M., Testi A., Antonioli L., Fornai M., Montagnani S., Ghisu N., Colucci R., Corona T., Blandizzi C., Del Tacca M. // *Clin. Ther.* 2009. V. 31. P. 1426–1453.
- Casper R.C., Gilles A.A., Fleisher B.E., Baran J., Enns G., Lazzeroni L.C. // *Psychopharmacology*. 2011. V. 217. P. 211–219.
- Rampono J., Simmer K., Ilett K.F., Hackett L.P., Doherty D.A., Elliot R., Kok C.H., Coenen A., Forman T. // *Pharmacopsychiatry*. 2009. V. 42. P. 95–100.
- Gentile S., Galbally M. // *J. Affect. Disord.* 2011. V. 128. № 1–2. P. 1–9.
- Altamura A.C., De Gaspari I.F., Rovera C., Colombo E.M., Mauri M.C., Fedele L. // *Hum. Psychopharmacol.* 2013. V. 28. № 1. P. 25–28.
- Jimenez-Solem E., Andersen J.T., Petersen M., Broedbaek K., Lander A.R., Afzal S., Torp-Pedersen C., Poulsen H.E. // *Am. J. Psychiatry*. 2013. V. 170. № 3. P. 299–304.
- Domar A.D., Moragianni V.A., Ryley D.A., Urato A.C. // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 1. P. 160–171.
- Casper R.C., Fleisher B.E., Lee-Ancajas J.C., Gilles A.A., Gaylor E., Debattista A., Houme H. // *J. Pediatr.* 2003. V. 42. P. 402–408.
- Olivier J.D.A., Blom T., Arentsen T., Homberg J.R. // *Progress Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011. V. 35. P. 1400–1408.
- Harris S.S., Maciag D., Simpson K.L., Lin R.C.S., Paul I.A. // *Brain Res.* 2012. V. 1429. P. 52–60.
- Homberg J.R., Schubert D., Gaspar P. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2010. V. 31. № 2. P. 60–65.
- Semple B.D., Blomgren K., Gimlin K., Ferriero D.M., Noble-Haeusslein L.J. // *Prog. Neurobiol.* 2013. V. 106–107. P. 1–16.
- Lee L.J., Lee L. J.-H. // *Developmental Neurobiol.* 2012. V. 72. № 8. P. 1122–1132.
- Karpova N.N., Lindholm J., Pruunsild P., Timmusk T., Castrén E. // *Eur. Neuropsychopharmacology*. 2009. V. 19. P. 97–108.
- Deiró T.C., Manhães-de-Castro R., Cabral-Filho J.E., Barreto-Medeiros J.M., Souza S.L., Marinho S.M., Castro F.M., Toscano A.E., Jesus-Deiró R.A., Barros K.M. // *Physiol. Behav.* 2006. V. 87. № 2. P. 338–344.
- Deiró T.C., Carvalho J., Nascimento E., Medeiros J.M., Cajuhi F., Ferraz-Pereira K.N., Manhães-de-Castro R. // *Arq. Neuropsiquiatr.* 2008. V. 66. № 3-B. P. 736–740.
- Hrdina P.D. // *J. Psychiatry Neurosci.* 1991. V. 16. № 2. P. 10–18.
- Kummet G.J., Haskell S.E., Hermann G.M., Ni C., Volk K.A., Younes A.K., Miller A.K., Roghair R.D. // *J. Nutr. Metab.* 2012. V. 2012. ID 431574.
- Halford J.C., Blundell J.E. // *Prog. Drug Res.* 2000. V. 54. P. 25–58.
- Lauder J.M., Tamir H., Sadler T.W. // *Development*. 1988. V. 102. P. 709–720.
- Bakke J.L., Lawrence N.L., Robinson S.A., Bennett J., Bowers C. // *Neuroendocrinology*. 1978. V. 25. № 5. P. 291–302.

26. Lopes de Souza S., Nogueira M.I., Bomfim de Jesus Deiro T.C., Manhaes de Castro F.M., Mendes da Silva C., Cesiana da Silva M., Oliveira de Lira L., Azmitia E.C., Manhaes de Castro R. // *Physiol. Behav.* 2004. V. 82. P. 375–379.
27. Mendes da Silva C., Goncalves L., Manhaes-de-Castro R., Nogueira M.I. // *Neurosci. Let.* 2010. V. 483. P. 179–183.
28. Kinast K., Peeters D., Kolk S.M., Schubert D., Homberg J.R. // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. V. 7. Article 72.
29. Mesquita A.R., Pego J.M., Summavielle T., Maciel P., Almeida O. F. X., Sousa N. // *Neurosci.* 2007. V. 147. P. 1022–1033.
30. Renoir T. // *Front. Pharmacol.* 2013. V. 4. № 45. P. 2–10.
31. Stenfors C., Ross S.B. // *Life Sci.* 2002. V. 71. № 24. P. 2867–2880.
32. Bosker F.J., Tanke M.A., Jongasma M.E., Cremers T.I., Jagtman E., Pietersen C.Y., van der Hart M.G., Gladkevich A.V., Kema I.P., Westerink B.H., et al. // *Neurochem. Int.* 2010. V. 57. № 8. P. 948–957.
33. Trouvin J.H., Gardier A.M., Chanut E., Pages N., Jacquot C. // *Life Sci.* 1993. V. 52. № 18. P. 187–192.
34. Stephansson O., Kieler H., Haglund B., Artama M., Engeland A., Furu K., Gissler M., Norgaard M., Nielsen R.B., Zoega H., et al. // *JAMA.* 2013. V. 309. № 1. P. 48–54.

УДК 577.322.4

Возможная функция гена *ribT* *Bacillus subtilis*: теоретическое предсказание, клонирование и экспрессия

А. П. Якимов^{1,2}, Т. А. Серегина³, А. А. Холодняк³, Р. А. Кренева¹, А. С. Мионов³,
 Д. А. Перумов¹, А. Л. Тимковский^{1,2*}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща

²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

³Государственный институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

*E-mail: alt@AT1660.spb.edu

Поступило в редакцию 24.04.2014

РЕФЕРАТ Полная расшифровка функций и взаимодействия элементов оперона биосинтеза рибофлавина (*rib*-оперон) у *Bacillus subtilis* необходима для создания сверхпродуцентов этого важнейшего витамина. Функция гена *ribT*, замыкающего оперон, до сих пор не определена. В представленной работе проведен поиск гомологов гипотетической аминокислотной последовательности продукта этого гена в базах данных, а также анализ гомологий, теоретически предсказано распределение элементов вторичной структуры, предложена третичная структура белка RibT. Нуклеотидная последовательность гена *ribT* была амплифицирована и клонирована в стандартный мультикопийный экспрессионный вектор pET15b, а затем экспрессирована после индукции ИПТГ в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3), содержащих индуцибельный ген РНК-полимеразы фага T7. Экспрессия гена *ribT* подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Белковый продукт экспрессии очищен с помощью аффинной хроматографии. Таким образом, показана принципиальная возможность получения белка RibT в количествах, достаточных для дальнейшего изучения его структуры и функциональной активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинформатика, индуцибельная экспрессия, клонирование гена, поиск гомологий, протеомика, теоретическая структура белка.

Основные этапы биосинтеза рибофлавина в клетках *Bacillus subtilis* были выяснены ранее. Оказалось, что этот процесс определяется двумя участками генома: *rib*-опероном и геном бифункциональной флавокиназы/FAD-синтазы *ribC*, входящим в состав оперона *truB-rpsO* [1, 2]. В состав *rib*-оперона, контролирующего весь путь образования рибофлавина, начиная с гуанозин-5'-трифосфата (стартовый предшественник), входят пять неперекрывающихся генов. Это четыре последовательно расположенных структурных гена: *ribG* (кодирует бифункциональную аминопиримидиндезаминазу/урацилредуктазу), *ribB* (ген рибофлавинсинтазы), *ribA* (ген GTP-циклогидролазы), *ribH* (ген люмазинсинтазы), а также замыкающий оперон – ген *ribT*, функция которого до настоящего времени не определена. Кроме того, этот оперон содержит три регуляторных элемента: регуляторную зону *ribO* с основным промотором P1 и два дополнительных внутренних промотора P2 и P3.

Ранее нами была определена относительная функциональная активность всех трех промоторов оперона [3]. При этом обнаружилось парадоксальное явление: промоторы P2 и P3 при их испытании порознь в составе соответствующих фрагментов оперона значительно различались по транскрипционной активности. Промотор P3, регулирующий транскрипцию гена *ribT*, в несколько раз превосходил по активности основной промотор P1. Промотор P2, наоборот, был в десятки раз слабее P1. При этом ни P2, ни P3 не регулируются флавинами, однако известно, что при транскрипции всего *rib*-оперона под контролем основного промотора P1 все элементы этого оперона транскрибируются согласованно с образованием полицистронной мРНК [4]. И это несмотря на наличие нескольких промоторов, различающихся по транскрипционной активности и механизму регуляции.

Функция гена *ribT* (по другим номенклатурам *urpK*) до настоящего времени остается совершен-

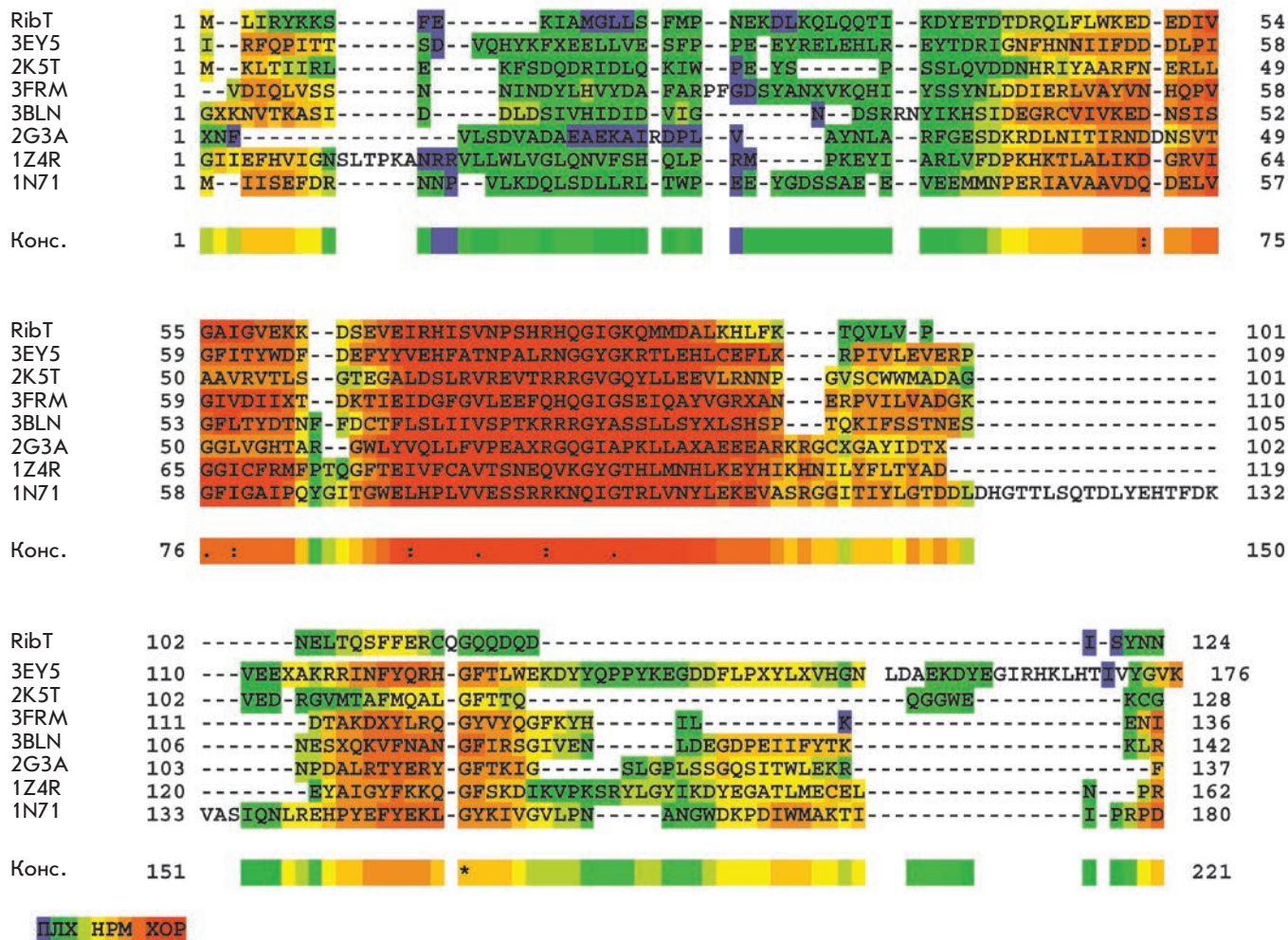


Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности белкового продукта гена *ribT* с предполагаемыми гомологами (цветовая схема описана по адресу <http://www.jalview.org/help/html/colourSchemes/clustal.html>). Конс. – консервативная последовательность; ПЛХ – плохо; НРМ – нормально, удовлетворительно; ХОР – хорошо

фрагмент ДНК элюировали из геля с помощью набора GeneClean фирмы Fermentas. Ген *ribT* клонировали в мультикопийный экспрессионный вектор pET15b, содержащий промотор фага T7, индуцируемый изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Вектор pET15b содержит нуклеотидные последовательности для His-Tag перед сайтом узнавания рестриктазы NdeI и для сайта-мишени тромбина. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *Escherichia coli* TG1. Отбор трансформантов проводили на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин в качестве селективного маркера. Скрининг рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР с использованием плазмидных праймеров pT7P – 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-ГГГ-3' и pT7T – 5'-ГСТАГТТАТТГСТСАГСГ-

ГТ-3'. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и при помощи рестриционного анализа определяли наличие вставки в гибридных плаزمидях. Этими плазмидями, обозначенными как pET15b/*ribT*, трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего индуцибельный ген РНК-полимеразы бактериофага T7.

Синтез белка RibT индуцировали, добавляя в ростовую среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Экспрессию гена *ribT* определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) общего белка клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*. В качестве контроля использовали лизат клеток штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b без вставки (рис. 4А).

В клеточном лизате штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*ribT*, после опосредованной

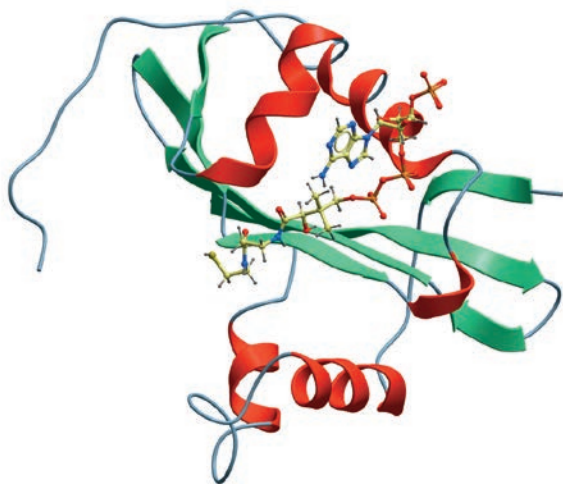


Рис. 3. Предполагаемая третичная структура продукта гена *ribT* в комплексе с ацетил-CoA

ИПТГ-индукции появляется дополнительная фракция белка с молекулярной массой приблизительно 14.5 кДа, что согласуется с расчетной молекулярной массой белка RibT (см. выше).

Меченный His-Tag рекомбинантный белок RibT выделяли с использованием TALON® Magnetic Beads (Clontech, США). Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*ribT*, выращенные в присутствии 1 мМ ИПТГ, собирали центрифугированием. Биомассу ресуспендировали в буфере следующего состава: 20 мМ натрий фосфат, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол. Клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин. Супернатант инкубировали вместе с TALON® Magnetic Beads в течение 1 ч при 4°C. Далее смолу промывали четырьмя объемами того же буфера. Элюцию белка проводили буфером: 20 мМ натрий фосфат, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол. Элюированные фракции белка анализировали с помощью SDS-PAGE-электрофореза (рис. 4Б). Полосы 7–10 принадлежали целевому белку с достаточно высокой степенью чистоты и молекулярной массой

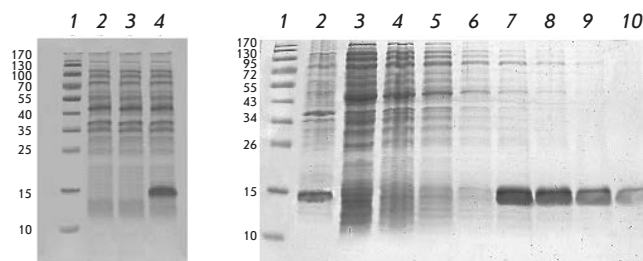


Рис. 4. Электрофоретический анализ (SDS-PAGE) экспрессии гена *ribT* и очистки рекомбинантного белка RibT. А – фракция общего белка из клеток *E. coli* BL21(DE3). 1 – белковый маркер; 2 – фракция белков клеток BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b без вставки *ribT*; 3 – фракция белков клеток BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*, выращенных без добавления ИПТГ; 4 – индукция белка RibT в клетках BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*, в присутствии 1 мМ ИПТГ. Б – белковая фракция из клеток BL21(DE3) pET15b/*ribT* до и после аффинной сорбции на TALON® Magnetic Beads. 1 – белковый маркер; 2 – фракция общего белка клеток BL21(DE3) pET15b/*ribT* после индукции ИПТГ; 3–6 – фракции, содержащие не связавшиеся белки; 7–10 – последовательная элюция фракций белка RibT, меченого His-Tag, в присутствии 300 мМ имидазола

около 14.5 кДа, что хорошо согласуется с теоретическим предсказанием.

ВЫВОДЫ

Теоретическая аминокислотная последовательность и анализ гомологий продукта гена *ribT* в банке PDB позволили осуществить молекулярное моделирование и предсказать возможную трехмерную структуру этого белка. Экспериментально осуществлена экспрессия гена *ribT* и доказана принципиальная возможность получения белка RibT в количествах, достаточных для дальнейшего изучения его структуры и функциональной активности. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-00476).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чикиндас М.Л., Миронов В.Н., Лукьянов Е.В., Борецкий Ю.Р., Арутюнова Л.С., Рабинович П.М., Степанов А.И. // Молекул. генет. микробиол. вирусол. 1987. Т. 4. № 1. С. 22–26.
2. Миронов В.Н., Перумов Д.А., Краев А.С., Степанов А.И., Скрябин К.Г. // Молекул. биология. 1990. Т. 24. № 3. С. 256–261.
3. Складорова С.А., Кренева Р.А., Перумов Д.А., Миронов А.С. // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1–9.
4. Mironov V.N., Kraev A.S., Chikindas M.L., Chernov B.K., Stepanov A.L., Skryabin K.G. // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 242. № 2. P. 201–208.
5. Perkins J.B., Sloma A., Hermann T., Theriault K., Zachgo E., Erdenberger T., Hannett N., Chatterjee N.P., Williams II V., Rufo Jr. G.A., et al. // J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 22. P. 8–18.
6. Jones D.T. // J. Mol. Biol. 1999. V. 292. P. 195–202.
7. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J., Meyer Jr. E.E., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. P. 535.
8. Abagyan R.A., Totrov M.M., Kuznetsov D.N. // J. Comp. Chem. 1994. V. 15. P. 488–506.
9. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Errais Lopez L., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. // Cell. 2002. V. 111. № 4. P. 747–756.
10. Serganov A., Huang L., Patel D.J. // Nature. 2009. V. 458. P. 233–237.

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 Редакцией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков (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, ответственно за переписку с редакцией, включая работу с коррек-

турой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.

- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3 – 6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, 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 сокращением (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 дата 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 отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде PDF-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, 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***

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

Альтернативные агентства:

Урал-пресс www.ural-press.ru,

Информнаука www.informnauka.com

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