

Письмо редакторов

Уважаемые читатели *Acta Naturae*! Вашему вниманию предлагается 20-й номер нашего журнала. Раздел «Форум» в этом номере необычен и представляет собой чисто научное сообщение А.А. Круглова и С.А. Недоспасова. Несмотря на свое, казалось бы, слегка легкомысленное название, – это очень серьезная публикация, посвященная подходам к решению интригующей загадки, чрезвычайно важной как для понимания фундаментальных проблем биохимии и физиологии человека, так и для практических задач медицины. Вопрос – каким образом иммунная система обеспечивает баланс в кишечнике и в норме не позволяет развиваться воспалительной реакции, авторы попытались приоткрыть использованием в качестве моделей трансгенных мышей, которые отличались от обычных дефектами экспрессии цитокинов в разных видах клеток – как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Нет смысла здесь пересказывать содержание этого сообщения, заметим только, что по материалам этой работы авторы только что опубликовали статью в *Science*, что, согласимся, в наше время для российских ученых – редкое событие. Поздравим А.А. Круглова и С.А. Недоспасова и их соавторов с этим выдающимся результатом и надеемся, что данное сообщение будет интересно самому широкому кругу читателей.

В номере предлагается вашему вниманию три обзора. Первый (Е.А. Никитина и др.) посвящен одной из самых привлекательных моделей, позволяющих напрямую связать гены, мозг, поведение и когнитивные функции, так называемому синдрому Уильямса. Второй (И.О. Петрусева и др.) – эксцизионной репарации нуклеотидов, и третий (В.В. Макаров и др.) – биотехнологическим подходам к получению металлических наночастиц. Как видно, тематика обзоров весьма разнообразна, что отвечает идеологии нашего журнала.

Экспериментальные статьи также весьма разнообразны по тематике. Мы считаем (хотя эта позиция иногда подвергается критике), что такой широкий охват проблем современной биологии в век узкой специализации (вплоть до непонимания многими исследователями терминологии разных биологических специальностей) делает наш журнал в чем-то уникальным! Кстати, пользуясь случаем, можем сообщить, что портфель редакции полон, что позволяет нам впредь более строго подходить к присылаемым сообщениям. Выражаем надежду, что такая позиция встретит понимание у читателей и будет способствовать дальнейшему повышению уровня ваших (и наших) публикаций.

До новых встреч! ●

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



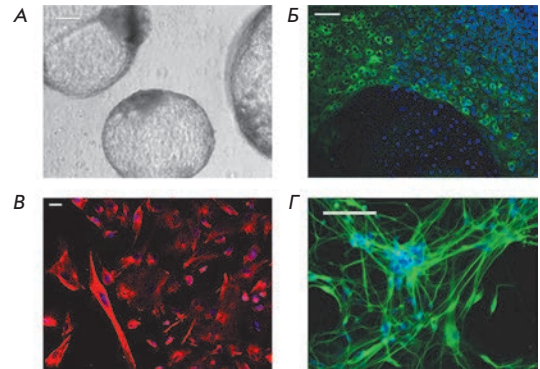
0+



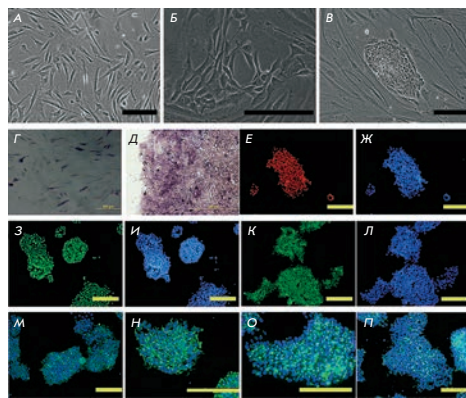
Система для изучения бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

И. В. Честков, Е. А. Васильева, С. Н. Иллариошкин,
М. А. Лагарькова, С. Л. Киселев

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, при котором наблюдается поражение верхних и нижних двигательных (моторных) нейронов. Примерно в 10% случаев БАС генетически наследуется, и самая распространенная семейная форма этого заболевания ассоциирована с мутациями в гене *SOD1*. Получены пациент-специфические индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), которые обладали свойствами плюрипотентных клеток и были способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны.



Спонтанная дифференцировка иПСК в производные трех зародышевых листков



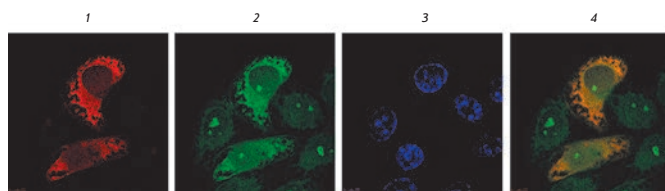
Получение иДПК

Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния

И. А. Мучаева, Э. Б. Дашинимаев, А. С. Артюхов, Е. П. Мягкова,
Е. А. Воротеяк, Е. Е. Егоров, Х. С. Вишнякова, Ю. Е. Кравченко,
С. П. Чумаков, В. В. Терских, А. В. Васильев

Клетки дермальной папиллы (ДП) – уникальные региональные стволовые клетки кожи, оказывающие индукционное влияние на формирование и цикл регенерации волосяного фолликула. При помощи трансфекции лентивирусными конструкциями, которые содержат гены репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, и добавлении вальпроевой кислоты в условиях физиологического уровня кислорода из клеток ДП человека получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Показано, что клетки дермальной папиллы можно использовать как альтернативный источник индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Встраивание сигнала направления в лизосомы инвариантной цепи изменяет деградацию обратной транскриптазы ВИЧ-1, повышая ее иммуногенность



Внутриклеточная локализация химерного белка RT-li

Е. С. Стародубова, М. Г. Исагулянц,
Ю. В. Кузьменко, О. А. Кротова, В. Л. Карпов
Внутриклеточный процессинг антигена, кодируемого ДНК-вакциной, является одним из ключевых этапов формирования иммунного ответа. ДНК-иммунизация антигенами, искусственно направленными в эндосомно-лизосомный компартмент и на презентацию в составе МНС класса II, приводит к индукции сильного иммунного ответа. Создан химерный ген обратной транскриптазы ВИЧ-1, который кодирует рекомбинантный белок с N-концевым коротким фрагментом инвариантной цепи молекулы МНС класса II человека, содержащим сигнал направления в лизосомы. ДНК-иммунизация мышей линии BALB/c плазмидой, кодирующей химерный белок, приводит к усилению иммунного ответа.

Acta Naturae

ТОМ 6, № 1 (20), ЯНВАРЬ—МАРТ 2014

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

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

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

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

Подготовка иллюстраций: И.А. Соловей, К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин

Корректур: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.
Телефон/факс: +7 (495) 930 87 07.
E-mail: actanaturae@gmail.com, vera.knorre@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2014

Номер подписан в печать 11 марта 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: 0.477

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

А. А. Круглов, С. А. Недоспасов
Микробиота, иммунитет кишечника
и мышьяная возня 6

ОБЗОРЫ

Е. А. Никитина, А. В. Медведева, Г. А. Захаров,
Е. В. Савватеева-Попова
Синдром Уильямса как модель изучения
пути гены—мозг—когнитивные функции:
генетика и эпигенетика 9

И. О. Петрусева, А. Н. Евдокимов, О. И. Лаврик
Молекулярные механизмы действия
системы общегеномной эксцизионной
репарации нуклеотидов 24

В. В. Макаров, А. Лав, О. В. Сеницына,
С. С. Макарова, И. В. Яминский,
М. Э. Тальянский, Н. О. Калинина
«Зеленые» нанотехнологии: синтез
металлических наночастиц
с использованием растений 37

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашинимаев,
А. С. Артюхов, Е. П. Мягкова, Е. А. Воротеляк,
Е. Е. Егоров, Х. С. Вишнякова, Ю. Е. Кравченко,
С. П. Чумаков, В. В. Терских, А. В. Васильев
**Репрограммирование клеток
дермальной папиллы человека
до плюрипотентного состояния** 48
- И. В. Честков, Е. А. Васильева,
С. Н. Иллариошкин, М. А. Лагарькова,
С. Л. Киселев
**Система для изучения бокового
амиотрофического склероза
на основе пациент-специфических
индуцированных плюрипотентных
стволовых клеток** 58
- Е. С. Стародубова, М. Г. Исагулянц,
Ю. В. Кузьменко, О. А. Кротова, В. Л. Карпов
**Встраивание сигнала направления
в лизосомы инвариантной цепи изменяет
деградацию обратной транскриптазы
ВИЧ-1, повышая ее иммуногенность** 66
- А. А. Хуторненко, А. А. Далина, Б. В. Черняк,
П. М. Чумаков, А. Г. Евстафьева
**Роль дигидрооротатдегидрогеназы в индукции
апоптоза при ингибировании III комплекса
дыхательной цепи митохондрий** 74
- Д. Н. Щербинин, И. Б. Есмагамбетов,
А. Н. Носков, Ю. О. Селянинов,
И. Л. Тутьихина, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов,
Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург
**Индукция иммунного ответа к *Bacillus
anthracis* при интраназальном введении
рекомбинантного аденовируса,
экспрессирующего протективный
антиген, слитый с Fc-фрагментом
антитела IgG2a** 82

А. В. Орлов, А. Г. Буренин, В. О. Шипунова,
А. А. Лизунова, Б. Г. Горшков, П. И. Никитин
**Разработка иммуноанализа с помощью
интерферометрической регистрации его
кинетики в реальном времени** 91

М. М. Мойсенович, А. Ю. Архипова,
А. А. Орлова, М. С. Друцкая, С. В. Волкова,
С. Е. Захаров, И. И. Агапов, М. П. Кирпичников
**Композитные матрицы на основе
фиброина шелка, желатина
и гидроксиапатита для регенеративной
медицины и культивирования клеток
в трехмерной культуре** 103

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Д. В. Панкратов, Ю. С. Зейфман, А. В. Дударева,
Г. К. Панкратова, М. Е. Хлупова, Ю. М. Парунова,
Д. Н. Зайцев, Н. Ф. Баширова, В. О. Попов,
С. В. Шлеев

**Влияние модификации поверхности
наночастицами золота на биоэлектродката-
литические параметры иммобилизованной
билирубиноксидазы** 110

Правила для авторов 115

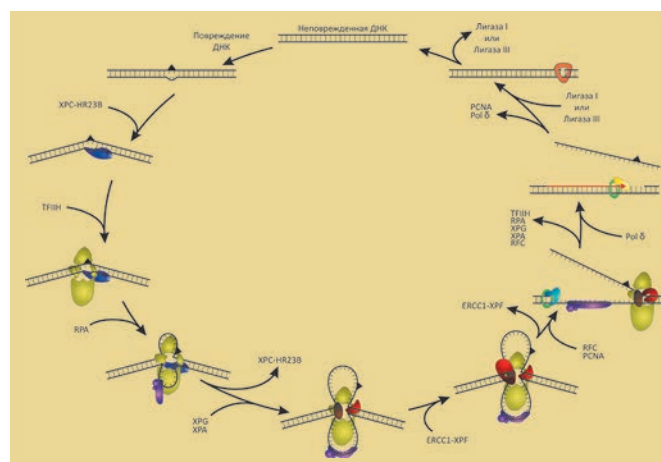


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Схема процесса общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов (см. статью Петрусевой и др.)

Микробиота, иммунитет кишечника и мышьяная возня

А. А. Круглов^{1,3}, С. А. Недоспасов^{1,2,3*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и кафедра иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

³Немецкий центр по исследованию ревматизма, 10117, Берлин, Германия

*E-mail: sergei@nedos.net

Состав микробиоты кишечника регулируется иммунной системой. В этой работе обсуждается роль цитокинов и лимфоидных клеток врожденного иммунитета в иммунорегуляции кишечника с помощью IgA.

Наш кишечник наполнен квадриллионами симбионтов – комменсальных бактерий, которые выполняют, как показали Honda и Littman [1], и полезные для организма функции. Открытие механизмов врожденного иммунитета высветило одну удивительную загадку – каким образом иммунная система обеспечивает баланс в кишечнике и в норме не позволяет развиваться воспалительной реакции. Ведь паттернраспознающие рецепторы на клетках врожденной ветви иммунитета – макрофагах и дендритных клетках – узнают комменсальные бактерии точно так же, как и условно-патогенные и патогенные бактерии. В результате этого распознавания запускаются защитные реакции, которые в случае своей избыточности опасны для организма.

С другим аспектом этой проблемы тесно связан вопрос о практическом применении антибиотиков, ведь «полезные» бактерии реагируют на них примерно так же, как и болезнетворные. Недавно Ubeda и др. [2] было убедительно показано, что при системной тера-

пии антибиотиками у модельных организмов могут развиваться нежелательные патофизиологические реакции, вплоть до возникновения неоплазий. Сформировано новое представление о том, что комменсальные бактерии «настраивают» иммунную систему в кишечнике, обеспечивая ей некий «тонирующий» сигнал.

Проведенный за последние годы с использованием новых технологий анализ многообразия комменсальных организмов в кишечнике человека и экспериментальных животных (микробиоты) привел к пониманию того, что от состава микробиоты зависит не только предрасположенность к различным заболеваниям, но и ответ на проводимую терапию.

Иммунитет кишечника обеспечивают те же инструменты, которые есть и у иммунной системы в целом, – это лимфоидные органы (Шейеровы бляшки и лимфатические узлы, специализирующиеся на обслуживании кишечника), арсенал клеток врожденного иммунитета (часть которых выполняет регуляторные функции), лимфоциты, в частно-

сти, продуцирующие защитные антитела (рис. 1).

В защите кишечника и регуляции состава микробиоты участвуют антитела, основной из которых – IgA. Для их продукции В-лимфоциты, исходно экспрессирующие мембранно-связанные антитела типа IgM, должны, во-первых, попасть в отделы кишечника, связанные с иммунитетом, а, во-вторых, под воздействием микроокружения и растворимых факторов «переключиться» на выработку IgA и стать плазматическими клетками (рис. 1). Известны несколько механизмов, ответственных за то, чтобы В-лимфоциты рекрутировались в собственную пластинку кишечника и переключились на продукцию IgA.

Ранее в нашей лаборатории были созданы уникальные мыши, которые были недавно использованы для изучения механизмов контроля синтеза антител класса IgA в кишечнике [3]. Чтобы объяснить, что и как было сделано, надо напомнить о методах «обратной генетики», в частности, так называемого «кондиционного нокаута» в мышах. Эта технология основана на манипуляциях с эмбриональными стволовыми клетками, и из млекопитающих разработана только для грызунов – мышей и (совсем недавно) крыс, что объясняет, почему большая часть све-

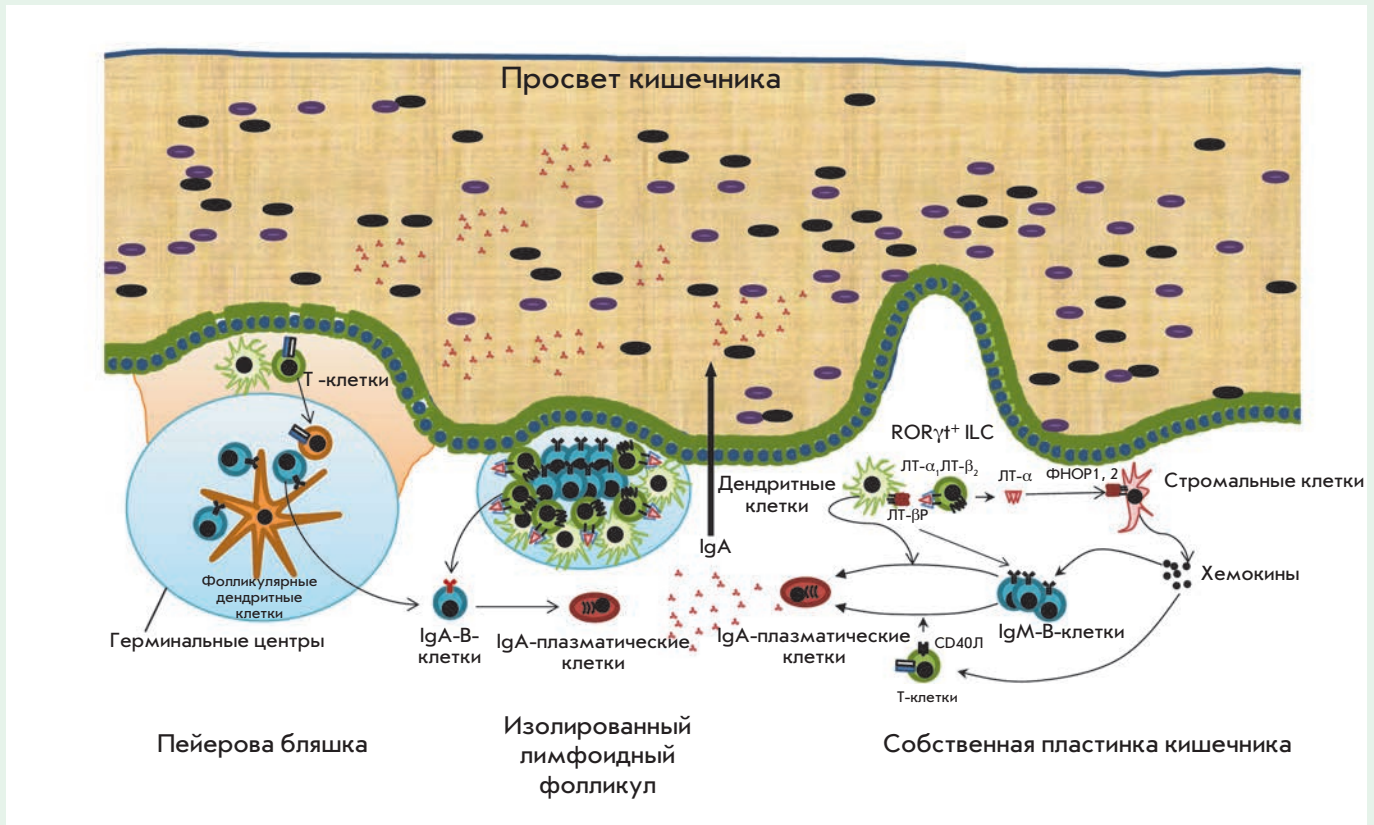


Рис. 1. Лимфоидная система и схема продукции IgA в тонком кишечнике. Переключение на IgA может индуцироваться в Пейеровых бляшках, изолированных лимфоидных фолликулах и собственной пластинке кишечника. В собственной пластинке кишечника индукция IgA контролируется ЛТ-α и ЛТ-β, производимыми лимфоидными клетками врожденного иммунитета третьего типа

дений о механизмах иммунитета получена именно на мышцах.

С помощью технологии кондиционного нокаута нами были созданы уникальные мыши, которые отличались от обычных дефектами экспрессии цитокинов в разных видах клеток – как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Если у таких мышей обнаруживались изменения фенотипа, например, функциональные дефекты в иммунной системе кишечника, то методом дедукции их можно было связать с функцией определенного цитокина, продуцируемого конкретным видом клеток.

Одна из областей наших научных интересов – цитокины семейства фактора некроза опу-

холей (ФНО, TNF), в частности лимфотоксины (ЛТ) α и β. Эти две молекулы образуют единый мембранный комплекс, поэтому считалось, что большая часть физиологических функций у них совпадает, так как сигнал передается через один рецептор – рецептор ЛТ-β (TNFRSF3). В то же время лимфотоксин-α может существовать в растворимой тримерной форме. В этом случае он очень похож на классический ФНО и использует его рецепторы (p55 и p75). До сих пор отдельные, уникальные (невыврожденные) функции растворимого ЛТ-α *in vivo* не были известны, так что ФНО-подобные свойства этого цитокина *in vitro* воспринимались как курьез.

Однако, когда мы «отключили» гены ЛТ-α и ЛТ-β в лимфоидных клетках врожденного иммунитета третьего типа (ILC3), которые характеризуются экспрессией транскрипционного фактора RORγt, то обнаружили различия, которые позволили нам охарактеризовать новый механизм регуляции иммунитета в кишечнике.

Оказалось, что, с одной стороны, мембранный комплекс ЛТ-α/ЛТ-β, передающий сигнал от ILC к стромальным и дендритным клеткам, регулирует рекрутирование В-лимфоцитов типа В1 и В2 в область собственной пластинки и переключение изотипа антител по особому механизму, в котором важную роль играют активные формы азота (рис. 1). С другой

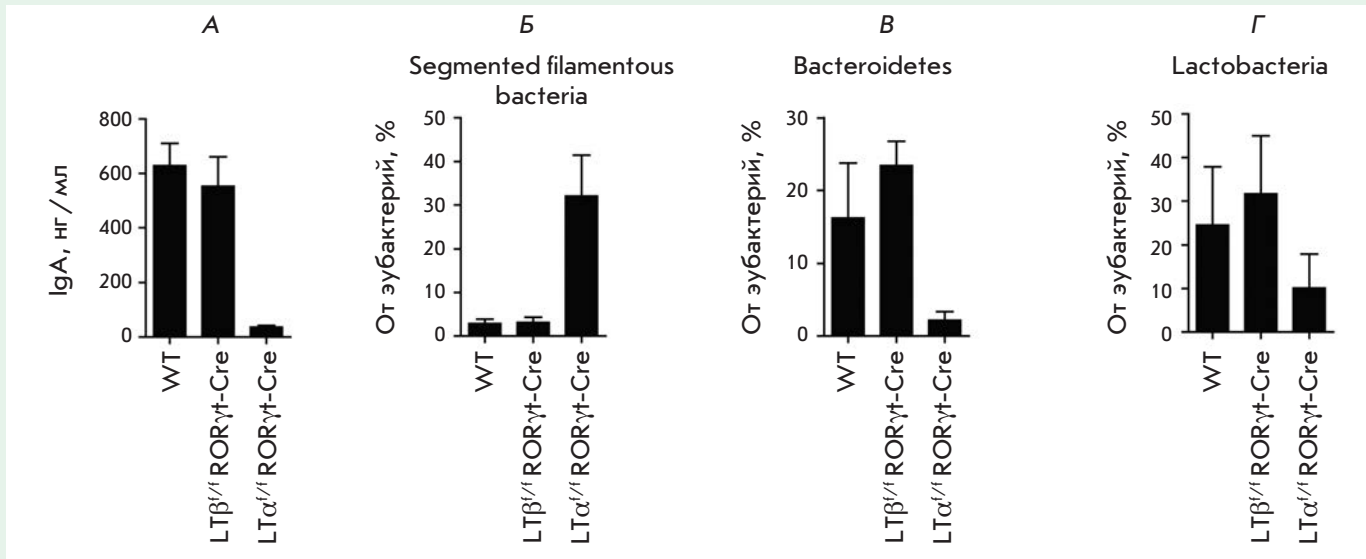


Рис. 2. Роль ЛТ-α и ЛТ-β, продуцируемых лимфоидными клетками врожденного иммунитета третьего типа, в контроле IgA и регуляции состава микробиоты. А – содержание IgA в фекалиях мышей дикого типа (WT) и мышей с делецией гена ЛТ-α (LTα^{fl/fl}RORγt-Cre) и ЛТ-β (LTβ^{fl/fl}RORγt-Cre) в лимфоидных клетках врожденного иммунитета третьего типа. Б – содержание сегментированных нитевидных бактерий, В – Bacteroidetes и Г – Lactobacteria в содержимом терминального отдела подвздошной кишки мышей WT, LTα^{fl/fl}RORγt-Cre и LTβ^{fl/fl}RORγt-Cre

стороны, растворимый тримерный ЛТ-α, действуя через рецепторы ФНО, рекрутирует не только В-, но и Т-лимфоциты, и именно Т-лимфоциты регулируют переключение с IgM на IgA, экспрессируют лиганд для CD40 рецептора В-лимфоцитов (рис. 1, 2).

Таким образом, мы впервые обнаружили функцию ЛТ-α (отличную от ЛТ-β) *in vivo*, и эта парадоксальная ФНО-подобная функция растворимого тримерно-

го ЛТ-α связана с регуляцией продукции IgA в кишечнике и с контролем микробиоты (рис. 2).

Важный клинический аспект нашего исследования, который нуждается в дополнительной проверке, состоит в том, что один из самых популярных терапевтических блокаторов ФНО – этанерсепт (Enbrel), который уже принимают миллионы больных ревматоидным артритом, блокирует растворимый ЛТ-α. До нашего исследования считалось,

что этот цитокин не имеет никаких отдельных функций, так что его попутная блокировка не рассматривалась как потенциальный источник побочных эффектов.

Интересно, что единственный известный вид аутоиммунных заболеваний, при которых эффективны все блокаторы ФНО, кроме этанерсепта, это как раз воспалительные патологии кишечника [4]. Объяснения этому парадоксу до сих пор нет... ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Honda K., Littman D.R. // Annu. Rev. Immunol. 2012. V. 30. P. 759–795.
2. Ubeda C., Taur Y., Jenq R.R., Equinda M.J., Son T., Samstein M., Viale A., Succi N.D., van den Brink M.R., Kamboj M., Pamer E.G. // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. P. 4332–4341.
3. Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G.M., Eberl G., Littman D., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. // Science. 2013. V. 342. № 6163. P. 1243–1246.
4. Sandborn W.J., Hanauer S.B., Katz S., Safdi M., Wolf D.G., Baerg R.D., Tremaine W.J., Johnson T., Diehl N.N., Zinsmeister A.R. // Gastroenterology. 2001. V. 121. P. 1088–1094.

УДК 575.22

Синдром Уильямса как модель изучения пути гены–мозг–когнитивные функции: генетика и эпигенетика

Е. А. Никитина^{1,2*}, А. В. Медведева^{1,3}, Г. А. Захаров^{1,3}, Е. В. Савватеева-Попова^{1,3}¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6² Российский государственный педагогический университет, 191186, Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, 48³ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

*E-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2013

РЕФЕРАТ Геномные болезни, или синдромы со множественными проявлениями, возникают спонтанно и непредсказуемо в результате протяженных делеций и дупликаций, генерируемых неравной рекомбинацией в хромосомных районах со специфической архитектурой. Одной из самых привлекательных моделей, позволяющих напрямую связать гены, головной мозг, поведение и когнитивные функции, считается синдром Уильямса. Этот синдром возникает в результате делеции протяженностью 1500 т.п.н. в районе 7q11.23. Эта делеция захватывает более 20 генов, а множественные проявления, обусловленные гемизиготностью этих генов, описываются триадой: 1) дефект зрительно-пространственного ориентирования; 2) вербально-лингвистический дефект; 3) гиперсоциализация. Делеция минимальной протяженности приводит к гемизиготности всего двух генов – *eln* и *limk1*, поэтому первый считают ответственным за сердечно-сосудистую, а второй – за когнитивную патологию. Поскольку когнитивная патология сглаживается с возрастом, изначальная убежденность в исключительной роли генов, напрямую определяющих морфологию мозга и поведение, сменилась представлениями о пластичности мозга и необходимости поиска эпигенетических факторов, влияющих на его развитие и функции, преломляемые в меняющемся поведении. В последние годы в качестве таких факторов рассматривают некодирующие микроРНК (miRs). В этой связи в обзоре рассмотрены следующие вопросы: можно ли создать достаточно простые системы, позволяющие анализировать вклад как отдельного гена, так и последствий его эпигенетической регуляции в становление когнитивного профиля при синдроме Уильямса? Можно ли в этих целях использовать дрозофилу?

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дрозофила, некодирующие РНК, синдром Уильямса, LIMK1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ WBS (Williams-Beuren syndrome) – синдром Уильямса-Бойрена; LCR (low copy repeat) – низкоповторяющиеся последовательности; NAHR (non allelic homologous recombination) – неаллельная гомологичная рекомбинация; нкРНК – некодирующие РНК.

СИНДРОМ УИЛЬЯМСА И ВЫЯСНЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИЙ ГЕНОТИП–ФЕНОТИП

В 1961 году Дж. Уильямс (J.C.P. Williams), резюмируя свои наблюдения четырех пациентов, предположил, что «одновременная встречаемость суправальвулярного стеноза и типичных физических и ментальных характеристик представляет собой новый, ранее не описанный, синдром» [1]. Вскоре, в 1962 году Бойрен (A.J. Beuren) описал еще 11 подобных пациентов. Все они, наряду с суправальвулярным стенозом аорты, имели специфические черты лица и умственную отсталость [2]. С тех пор за этим набором симптомов прочно закрепился эпоним «синдром Уильямса –

Бойрена» (Williams-Beuren syndrome, WBS), тем не менее чаще называемый «синдром Уильямса». Оказалось, что к возникновению синдрома приводит делеция протяженностью 1500 т.п.н. в районе q11.23 хромосомы 7 человека, специфическая архитектура которого предрасполагает к неравной рекомбинации. Делеция захватывает около 20 генов, гемизиготность которых имеет множественные проявления: специфические, эльфоидные черты лица (рис. 1), нарушения развития, различные сердечно-сосудистые патологии, неврологические аномалии и когнитивные особенности, повышенную общительность и музыкальную одаренность [3]. Эта комбинация необычных

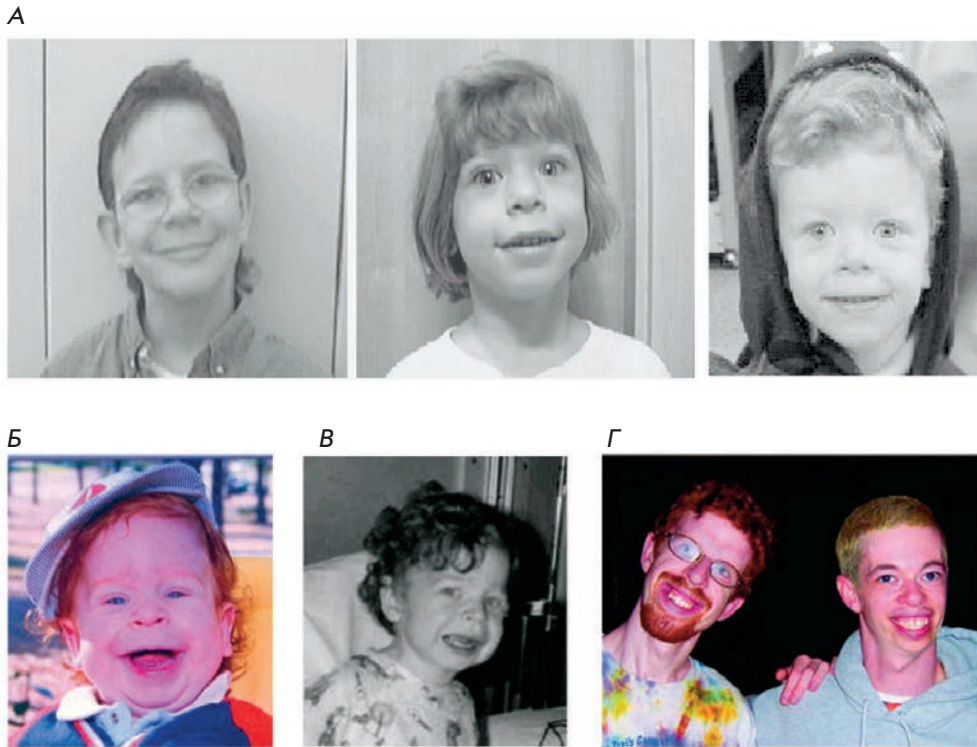


Рис. 1. Характерные черты лица у пациентов с синдромом Уильямса (А) [5]. Ребенок в возрасте 15 месяцев (Б) и 3 лет (В) (характерные особенности – широкий рот, полные щеки, маленький нос, длинный подносовой желобок и нежный подбородок), тот же пациент в возрасте 21 года (слева), в возрасте 28 лет (справа) (Г) [3]

свойств интриговала и манила нейробиологов возможностью понять модульный принцип построения умственных способностей и социального поведения, отражающий особенности развития мозга. На протяжении последних 20 лет казалось, что синдром Уильямса является одной из самых привлекательных моделей, позволяющих напрямую связать гены, мозг, поведение и когнитивные функции [4, 5].

К неврологическим аномалиям относят гиперактивность, нарушения моторной координации и походки [6, 7]. Когнитивные проявления весьма своеобразны, поэтому именно они вместе с неврологическими признаками используются для диагностики WBS у маленьких детей. Первое проявление – это ярко выраженный дефект зрительно-пространственного ориентирования, пациенты не могут воспроизвести предлагаемую в стандартных тестах форму объекта, но отражают все его детали (рис. 2) [8].

Зрительно-пространственное конструирование – это способность воспринимать объект или рисунок как набор частей, а затем из этих частей строить реплику – точную копию или репродукцию увиденного. Люди используют зрительно-пространственное конструирование, когда рисуют, застегивают рубашки, застилают постель, создают модели парусников и летательных аппаратов, собирают конструктор LEGO или мебель, приобретенную в разобранном

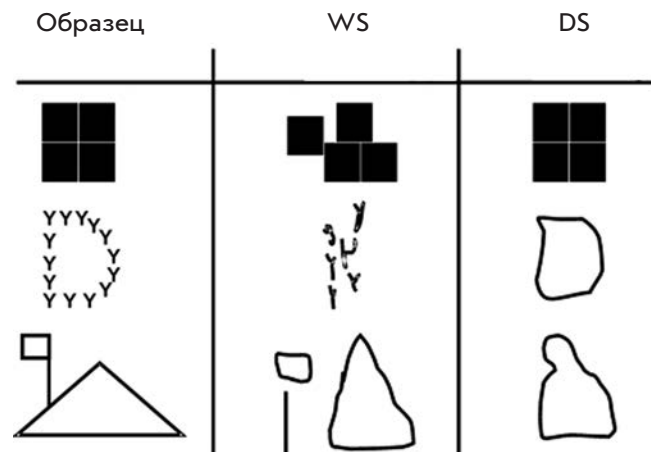


Рис. 2. Дефект зрительно-пространственного конструирования у пациентов с синдромом Уильямса [8]. Левая панель – задания, предлагаемые пациентам с просьбой воспроизвести образец. Центральная панель – WS – пациенты с синдромом Уильямса воспроизводят только детали, не воспринимая общей формы. Правая панель – DS – пациенты с синдромом Дауна того же возраста и сопоставимого IQ воспроизводят только общие контуры форм

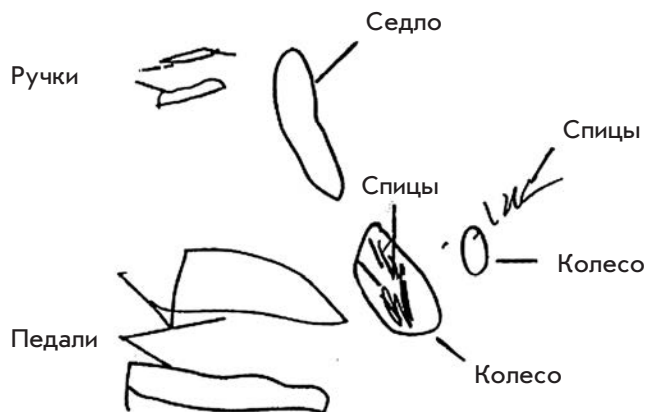


Рис. 3. Изображение велосипеда пациентом с синдромом Уильямса в возрасте 9 лет 7 месяцев [10]

виде в IKEA. Зрительно-пространственное конструирование настолько важно для ежедневной жизни, что по праву считается центральной когнитивной способностью. Поэтому измерение этой способности обязательно является составной частью любого полномасштабного определения умственных способностей.

Из-за нарушения зрительно-пространственного конструирования японским детям трудно дается письмо иероглифами [9]. При просьбе нарисовать велосипед дети представляют картинку из отдельных, четко воспроизведенных и подписанных элементов: ручки, седло, педали, колеса, спицы (рис. 3) [10]. При этом многие пациенты не имеют бинокулярного зрения, нормального восприятия пространства и его глубины, отчего сталкиваются с ежедневными проблемами при ходьбе и играх на неровных поверхностях. Второе проявление – оценочная лексика, необычайно развитая в ущерб грамматике, когда обилие эмоциональных междометий, вздохов и акцентов служит своеобразным «крючком» для привлечения и удержания внимания посторонних. С этим связано третье проявление – гиперсоциализация – потребность установления контактов с любимыми, в том числе и с незнакомыми окружающими, необычайно высокая симпатия к ним и стремление осчастливить каждого. В последнее время это проявление когнитивных особенностей рассматривается и как одно из ведущих: вне зависимости от предъявляемого теста пациенты постоянно и пристально рассматривают лица экспериментаторов, не обращая внимания на существование теста [11]. Таким образом, когнитивные нарушения

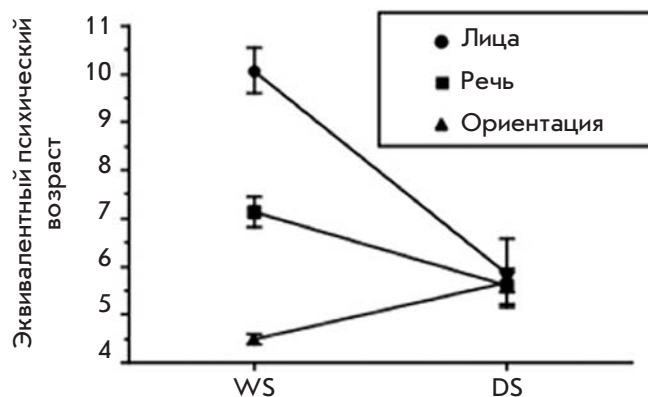


Рис. 4. Триада когнитивных особенностей у пациентов с синдромом Уильямса (WS) и с синдромом Дауна (DS) того же возраста и сопоставимого IQ [5]. Обозначения: ● – фиксация на лицах; ■ – лингвистические способности; ▲ – зрительно-пространственное ориентирование. Пациенты с DS равно неуспешны по всем трем показателям когнитивных способностей и выполняют их так, как и ожидается при умственной отсталости. Пациенты с WBS демонстрируют ярко выраженные дефекты зрительно-пространственного ориентирования, имеют сниженные лингвистические способности и проявляют экстремальную гиперсоциализацию – фиксацию на лицах посторонних

при синдроме Уильямса описываются триадой проявлений: 1) резко выраженный дефект зрительно-пространственного ориентирования; 2) промежуточный, варьирующий в зависимости от сложностей языковой культуры вербально-лингвистический дефект; 3) необычайно высокая пристальность взора – фиксация его на лицах (рис. 4).

Жизненные неудобства, причиняемые проявлениями этой триады, компенсируются высокой музыкальной одаренностью – каждый пациент великолепно играет на каком-либо инструменте или поет. Необычайно высокая тяга к музыке позволяет воспринимать и воспроизводить явления окружающего мира в музыкальных, а не в зрительных образах. Так, функциональная электромагнитная интроскопия (magnetic resonance imaging) мозга показала, что у пациентов с WBS, в отличие от их здоровых ровесников, при предъявлении музыкальных или каких-либо звуковых стимулов происходит активация зрительной коры [12]. С одной стороны, феномен WBS заставляет пересмотреть укоренившиеся стереотипы: действительно ли в человеке все должно быть прекрасно, и так ли нам важно то, как рисовали Паганини, Бетховен и Бах. С другой стороны, четкость и дискретность когнитивных проявлений постоянно побуждает к их

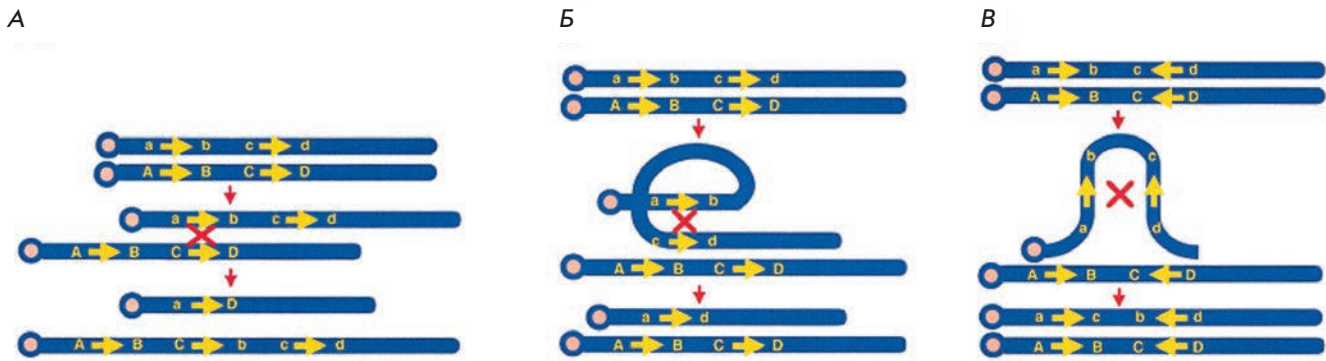


Рис. 5. Схема возникновения геномных перестроек при рекомбинации по повторяющимся последовательностям (дупликациям) [17]. А – межхромосомная рекомбинация по прямым повторам, приводящая к генерации делеции и/или дупликации; Б – внутривхромосомная рекомбинация по прямым повторам (рекомбинация в одном гомологе), приводящая к генерации делеции; В – внутривхромосомная рекомбинация по обращенным (инвертированным) повторам, приводящая к генерации инверсии. Повторяющиеся последовательности обозначены стрелками, уникальные фланкирующие последовательности в разных аллельных состояниях обозначены латинскими заглавными и строчными буквами

сопоставлению с определенным геном, попадающим в область делеции критического для WBS района. Напомним механизм возникновения геномных болезней, т.е. делеционно-дупликационных синдромов.

НЕАЛЛЕЛЬНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ, ПРИВОДЯЩАЯ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ СИНДРОМА УИЛЬЯМСА

Геномные болезни, или синдромы со множественными проявлениями, возникают спонтанно и непредсказуемо (спорадически) в результате протяженных делеций и дупликаций, генерируемых неравной рекомбинацией в хромосомных районах со специфической архитектурой. Это синдромы Уильямса в 7q11.23 [3], Смит–Магениса в 17p11.2 [13], Ди Джорджи в 22q11.2 [14], Прадера–Вилли–Ангельмана в 15q11–q13 [15], дупликационный синдром (17)(p11.2p11.2) и синдромы с делециями Y-хромосомы [16]. Высокая частота таких структурных перестроек генома, значительно превышающая частоты появления болезней из-за мутаций какого-либо одного гена, привлекла внимание клиницистов и привела к формированию концепции «геномных болезней».

В большинстве делеционно-дупликационных синдромов перестроенный хромосомный сегмент фланкируют большие (обычно 10–500 т.п.н.), высокоомологичные низкоповторяющиеся последовательности (low copy repeat – LCR), по которым происходит рекомбинация. В связи с тем, что в данном случае рекомбинируют не аллельные, хотя и гомологичные, последовательности, появился термин неаллельная гомологичная рекомбинация (non allelic homologous recombination – NAHR). В результате NAHR между

прямыми повторами в одной и той же хромосоме возникают дупликации и делеции, в обратной ориентации – инверсии (рис. 5). NAHR между хромосомами приводит к образованию транслокаций [17].

Наиболее детально роль LCR в геномных болезнях изучали на примере WBS [18]. Делецию при WBS фланкируют три LCR (центромерный, медиальный и теломерный), каждый из которых состоит из блоков А, В и С [19]. Блоки центромерных и медиальных повторов располагаются в одной и той же ориентации, но в разном порядке, в то время как теломерный сегмент имеет тот же порядок, но противоположную ориентацию (рис. 6). Блок В состоит из трех генов в медиальной локализации (Вm) (*GTF2I*, *NCF1*, *GTF2IRD2*), предполагаемых псевдогенов в центромерном районе (Вс) (*GTF2IP1*, *NCF1P1*, *GTF2IRD2P1*) и в теломерном (Вt) (*GTF2IP2*, *NCF1P2*, *GTF2IRD2P2*). У большинства больных (95%) делеция размером 1550 т.п.н. возникла в результате негомологичного кроссинговера между центромерным (Вс, а в случае инверсии у родителей теломерным Вt) и медиальным блоком повторов. Более протяженная делеция (1840 т.п.н.) обусловлена обмeнами между блоками Ас и Ам, зарегистрированными в 5% случаях. Очевидна предпочтительная локализация обменов в блоке В. Хотя разрывы могут происходить в любом месте повтора, тем не менее заметна тенденция к образованию кластеров разрывов в проксимальном районе блоков Вc/Вm, где, по-видимому, локализуется горячая точка размером 12 т.п.н., что составляет 11.4% всей последовательности блока. Именно на этот район приходится 67% рекомбинации.

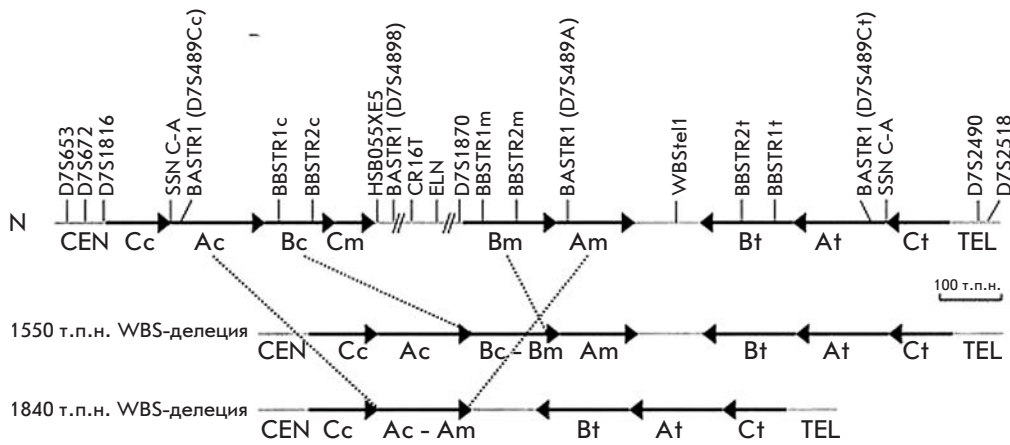


Рис. 6. Структура района 7q11.23 в нормальных хромосомах (N) и хромосомах с WBS-делецией, приводящей к синдрому Уильямса [18]. Блоки А, В и С центромерных (с), медиальных (m) и теломерных (t) LCRs показаны черными стрелками. Пределы типичной делеции (1550 т.п.н.) и более редкой делеции (1840 т.п.н.) обозначены пунктиром

Полиморфизм в организации LCR, фланкирующей делецию, позволяет предполагать возможность и других геномных перестроек. Действительно, в 30% случаев у родителей детей с WBS находят инверсию, перекрывающую весь WBS-интервал [20]. Считается, что делеция района WBS обусловлена внутрихромосомной или межхромосомной неаллельной рекомбинацией, в этом случае решающее значение имеет идентичность повторов [21]. Однако при наличии инверсии у родителей [18] негомологичный кроссинговер происходит в первом делении мейоза и затрагивает последние 38 т.п.н. блока Bt, которые отсутствуют в блоке Bc. Позиционное предпочтение обменов NAHR может быть обусловлено дополнительными архитектурными особенностями этих районов. В некоторых случаях, что важно для последующего рассмотрения, рядом с горячей точкой находятся палиндромы, способные формировать шпильки [22].

Гены, локализованные в районе делеции

В район делеции попадают следующие гены (рис. 6). Большинство из них (две трети) кодируют белки, в какой-то мере организующие пространство в ядре или цитоплазме. Так, часть из них кодирует факторы транскрипции (WBSCR9/WSTF, WS-bHLH, WBSCR11/GTF2IRD1), которые формируют белковые компартменты ядра, а другие участвуют в реорганизации цитоскелетных и мембранно-связанных структур (LIMK1, STX1A, CYLN2, TBL2, CLDN4/CPTER1, CLDN3/CPTER2). Приведем краткую характеристику некоторых генов.

frizzled-9 (fzd9) – кодирует белок Frizzled-9, сходный с рецептором wnt дрозофилы. Этот ген участвует в развитии гиппокампа у мышей. Гемизиготное состояние только этого гена ведет к серьезным когнитивным отклонениям, в том числе нарушениям

нейроанатомии гиппокампа и, как следствие, памяти и пространственной ориентации [23], что очень сходно с проявлениями комплексного эффекта делеции при синдроме Уильямса.

stx1a – кодирует STX1A, синтаксин 1А – член семейства синтаксинов, специфичный для головного мозга белок с молекулярной массой 35 кДа, необходимый для высвобождения медиатора из синаптического пузырька. Синтаксин 1А взаимодействует с синаптотагмином и другими белками синапсом [24], поэтому возникает предположение о роли гемизиготности по гену синтаксина в неврологической симптоматике WBS [25].

eln – кодирует тропоэластин, компонент эластических волокон. Этот ген расположен в середине делетируемого района и поэтому является маркером делеции. Гемизиготность по гену тропоэластина приводит к формированию стенозов, истончению стенок артерий, недоразвитию мышц. По-видимому, именно с этим связана специфическая альфоидная внешность больных WBS [26].

cyln2 – кодирует цитоплазматический линкерный белок CLIP-115, который подсоединяет эндосомы к растущим микротрубочкам, специфически связываясь с их концами. Таким образом, CLIP-115 участвует в реорганизации микротрубочек и осуществляет их взаимодействие с различными клеточными структурами. CLIP-115 экспрессируется преимущественно в головном мозге и локализуется в ламеллярном теле дендритов.

wbscr11/gtf21rd1 – кодирует фактор транскрипции GTF2I, содержащий характерный мотив helix-loop-helix, и регулятор кальциевых каналов TFII-I с высокой и повсеместной экспрессией.

limk1 – кодирует нерцепторную серинтреониновую протеинкиназу, ключевой фермент ремоделирования актина [22, 27]. Молекула LIMK1

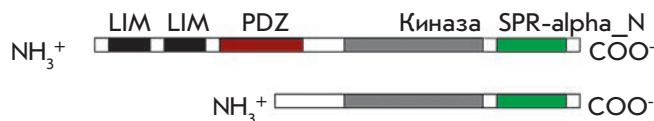


Рис. 7. Доменная структура LIMK1. Вверху – изоформа С; внизу – изоформа D, отсутствуют оба LIM-домена и PDZ-домен

состоит из четырех доменов – киназного, двух LIM и одного PDZ (рис. 7). Делеция LIM и PDZ, ответственных за взаимодействие с другими белками, увеличивает киназную активность молекулы, что свидетельствует о регуляторной функции этих доменов [28]. Через LIM-домен LIMK1 взаимодействует с целым рядом белков, включая протеинкиназу С, цитоплазматический домен трансмембранного лиганда нейрегулина [29]. Рис. 8 дает представление о сигнальном пути ремоделирования актина.

Активность LIMK1 регулируется членами семейства Rho GTP-аз – Rho, Rac и Cdc42, через

протеинкиназу ROCK, активируемую p21 киназу (РАК) – РАК1 и РАК4 соответственно. Эти киназы фосфорилируют LIMK1 по Thr508 в петле киназного домена, что приводит к ее активации [30]. Мишенью LIMK1 служит кофилин, который, присоединяясь к острому концу актинового филамента, участвует в деполимеризации актина. При фосфорилировании кофилина LIMK1 происходит его ингибирование и отсоединение от актиновых филаментов. Таким образом, LIMK1, переключая кофилин из активного в неактивное состояние, контролирует динамику актина [31]. Реорганизация актинового цитоскелета вовлечена в процессы перемещения нейронов и роста нейритов. Ремоделирование актина необходимо для появления и модификации шипиков дендритов, которые образуют большинство синаптических связей в гиппокампе и других участках мозга, и таким образом опосредует обучение и сохранение памятного следа. Кроме того, физиологическим субстратом LIMK1 служат факторы транскрипции CREB и Nurr1, а LIMK1 фосфорилирует также основные белки миелина и гистоны *in vitro* [29].

LIMK1 в сигнальном каскаде ремоделирования актина

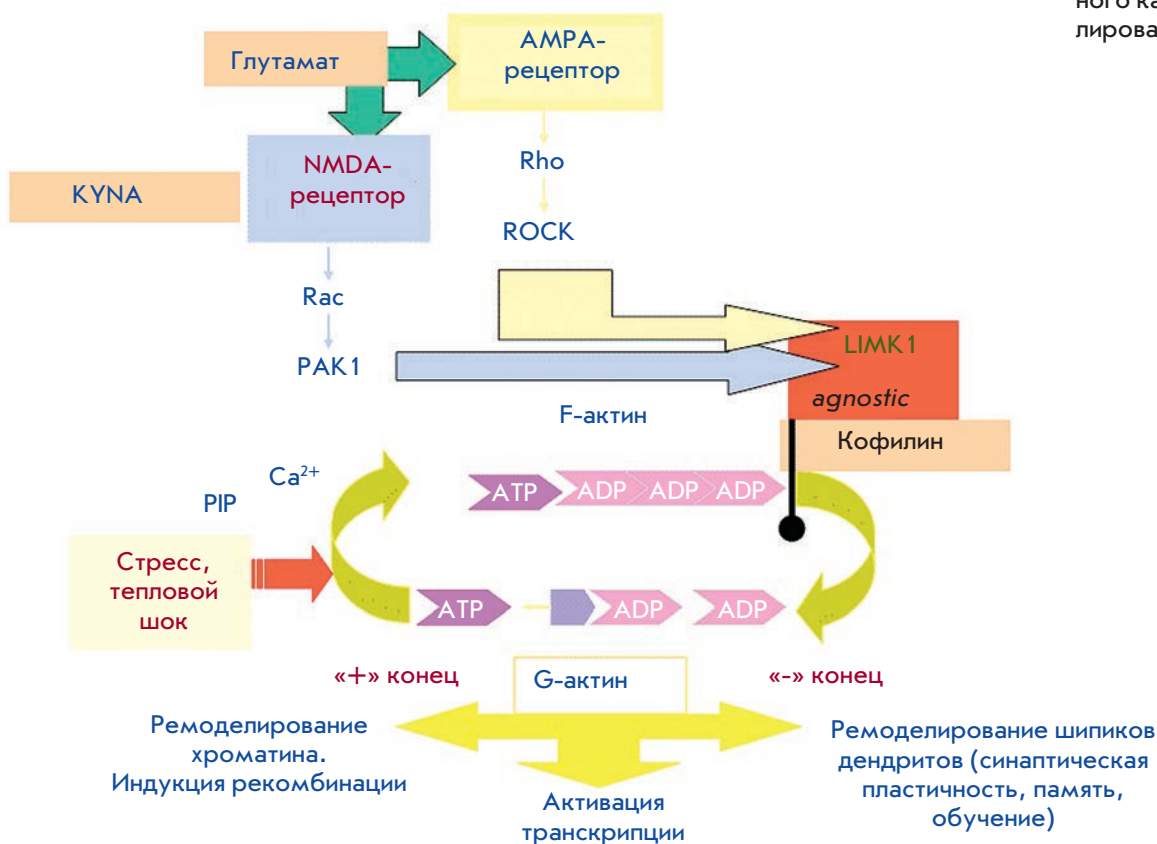


Рис. 8. Схема сигнального каскада ремоделирования актина

К настоящему времени установлены гены-партнеры, белковые продукты которых взаимодействуют с LIMK1 (рис. 9).

Предполагается, что гемизиготность по этому гену является одним из факторов, определяющих дефекты визуально-пространственного поведения при WBS. Список генов, входящих в делецию, продолжает расти и содержит уже 28 генов. Пока же достаточно полно он представлен в обзоре [8], как раз и имеющем целью установление корреляций генотип-фенотип.

Поскольку делеция минимальной протяженности приводит к гемизиготности всего по двум генам – *eln* и *limk1* (рис. 6), то в результате изучения их проявлений первый ген стали рассматривать в качестве ведущего в генезе сердечно-сосудистой, а второй – когнитивной патологии. Это представление основывалось на сравнительной характеристике экспрессии

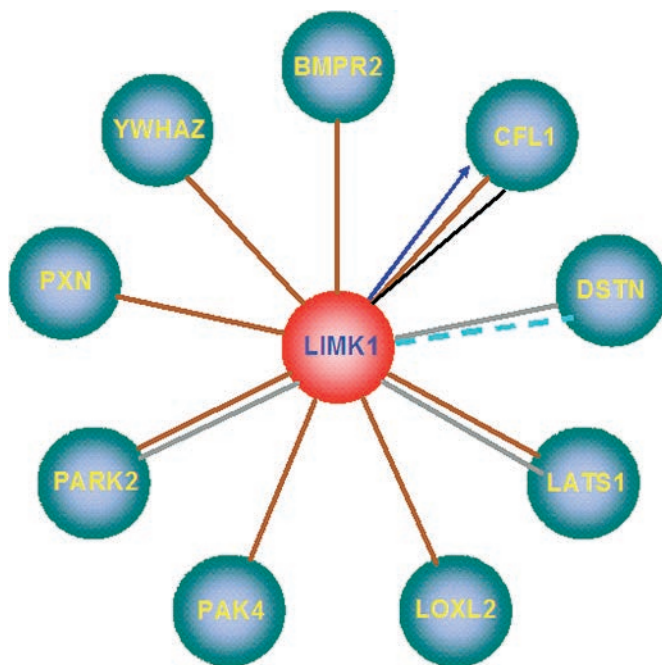


Рис. 9. Взаимодействие LIMK1 с другими белками. BMPR2 – костный морфогенетический рецептор белка, тип II (серин-треонин киназа); CFL1 – кофилин 1 (немышечный); DSTN – дестрин (фактор деполлимеризации актина); LATS1 – большой опухолевый супрессор, гомолог 1 (*Drosophila*); LOXL2 – лизил-подобная оксидаза (*Drosophila*); PAK4 – p21 белок Cdc42/Rac, активируемый киназой 4; pARK2 – паркин 2 (*Drosophila*); PXN – паксиллин; YWHAZ – белок-активатор тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы, z-полипептид *Drosophila* ген *leonardo* (влияет на ольфакторное обучение)

обоих генов в головном мозге: экспрессия *eln* была весьма незначительной, тогда как уровень экспрессии *limk1* был очень высоким и достигал максимального значения в коре головного мозга [32]. Но если это исследование убедительно доказывало роль гемизиготности по гену *limk1* в становлении дефектов зрительно-пространственной ориентации, то другое не могло подтвердить эту роль [33].

Здесь следует напомнить, что, хотя делеция, приводящая к синдрому Уильямса, и возникает с частотой, превосходящей частоту мутаций единичного гена в силу более высоких частот неравной рекомбинации, тем не менее в каждое исследование попадает не столь большое число пациентов (в данное время в Санкт-Петербурге их пять). Как правило, при подтверждении делеции не устанавливаются ее границы – точки разрывов в хромосоме, а спонтанность и непредсказуемость возникновения делеций исключает внутрисемейный анализ. Однако в редких случаях он возможен, поскольку встречаются семьи с идентичными делециями [34].

Так, в пяти семьях с суправальвулярным стенозом артерии выявлена маленькая делеция, приведшая у всех к синдрому Уильямса и затронувшая ген *limk1*, но не *fkbp6* или *gtf2i*. Поскольку у всех носителей этой делеции наблюдались дефекты зрительно-пространственного ориентирования, но не умственная отсталость, роль в генезе первой оставили за LIMK1, тогда как в генезе умственной отсталости заподозрили участие фактора транскрипции GTF2I [35].

Однако известные ограничения при работе с людьми вызвали необходимость обращения к животным моделям. Естественно, что в первую очередь попытки установления роли конкретного гена в проявлениях синдрома Уильямса были предприняты на мышах. Этот объект обеспечивает легкость получения носителей нуль-мутаций, гипоморфных и точечных мутаций и делеций, включающих многие гены из интересующего района [36]. Кроме того, в отличие от человека, у которого может пострадать только один ребенок, получивший случайным образом хромосому с делецией либо от мамы, либо от папы, у мышей можно получить большое число потомков с одинаковыми генетическими нарушениями.

Следует отметить, что порядок генов, входящих в делецию, эволюционно консервативен – у мышей он такой же, как и у человека (рис. 10). Однако сам район, имея точки разрывов точно в тех же фланкирующих последовательностях, инвертирован по отношению к геномной карте одноименного района у человека и не содержит низкокопийных повторов [18].

Данные, накопленные за последние 10 лет, свидетельствуют, что гемизиготность по аналогичным

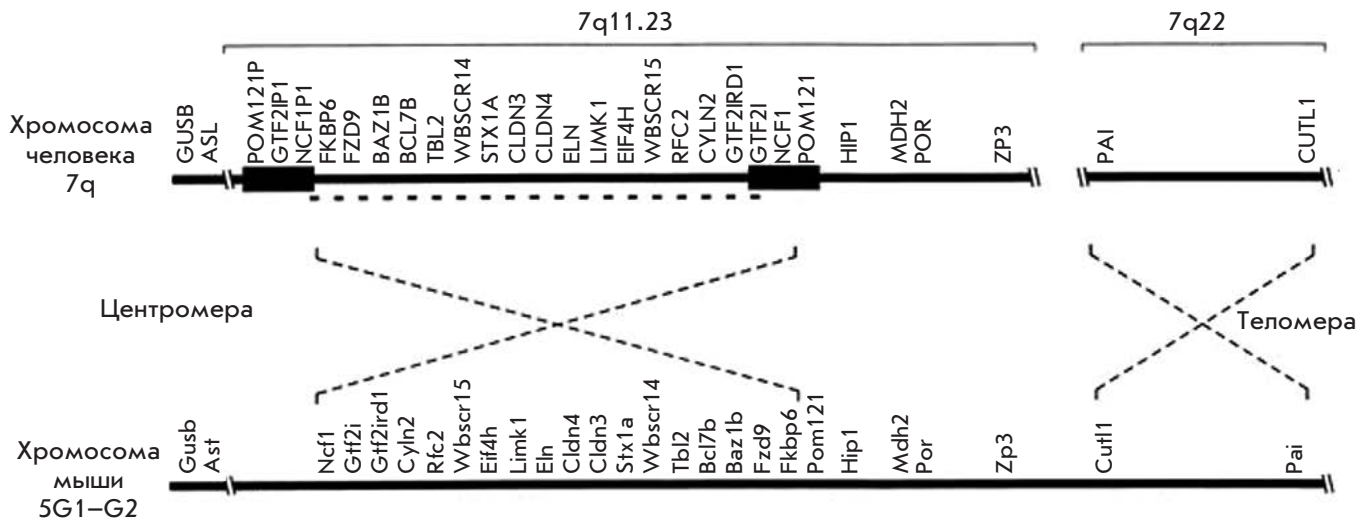


Рис. 10. Порядок генов в пределах WBS-района у человека и мыши. Пунктиром указана инверсия относительно теломеры и центромеры каждого из видов [19]

генам у человека и мыши не всегда приводит к сходным проявлениям. Тем не менее убедительно доказано, что в становлении когнитивных и поведенческих проявлений участвуют, как и у человека, два гена, контролирующих функции цитоскелета за счет регуляции динамики актина (*limk1*) [37] и сети микротрубочек (*clip2*) [38]. Гемизиготность по гену *cyln2* (*clip2*) у мышей приводит к повреждениям, характерным для WBS, умеренным нарушениям развития, моторной координации, морфологии мозга, дисфункции гиппокампа.

Однако очень мало внимания было уделено анализу участия как этих, так и всех исследованных генов мышей, в контроле зрительно-пространственной ориентации [36]. Этот процесс, называемый также пространственной памятью, за которую отвечает гиппокамп, может быть протестирован у мышей в водном лабиринте Морриса. Помещенные в него мыши учатся быстро и правильно спасаться на невидимой подводной платформе, определяя ее местонахождение при ориентации по «сигналам» окружающей среды – специально нарисованным на стенах комнаты вокруг лабиринта знакам или случайно расположенным предметам (выключатели и т.п.). Нокдаун только одного гена *limk1* приводит к резкому нарушению зрительно-пространственного ориентирования за счет физиологических и морфологических дисфункций гиппокампа [37]. Первые проявляются в нарушениях синаптической пластичности – длительной потенциации, вызываемой дефектностью NMDA-рецепторов, вторые – в изменениях морфологии шипиков дендритов пирамидных клеток гиппо-

кампа, что указывает на непосредственную функцию LIMK1, ключевого фермента ремоделирования актина, определяющего морфологию шипиков.

По-видимому, не только гемизиготность самой LIMK1, но и происходящее в результате гемизиготности нарушение взаимодействия с белками-партнерами LIMK1 (*рис. 9*), например, такими, как продукт аутосомно-рецессивного гена *park2* (*parkin*), может вызывать когнитивные расстройства. Напомним, что этот ген ответствен за раннее начало болезни Паркинсона, его продуктом является убиквитин-Е3-лигаза. Недавно анализ делеции WBS у мышей привел к обнаружению еще неосознанного факта: ген *trim50* кодирует убиквитин-Е3-лигазу [39].

ОТ ГЕНЕТИКИ К ЭПИГЕНЕТИКЕ

Казалось бы, что функциональная роль фермента LIMK1 и кодирующего его гена при становлении патологии синдрома Уильямса доказана, если бы не накопившиеся к этому времени данные длительного анализа когнитивных проявлений у одних и тех же пациентов, превратившихся из маленьких детей в подростков и молодых людей. Выяснилось [9, 40], что с возрастом сглаживаются как зрительные дефекты – становится возможным восприятие и отображение не только деталей, но и формы, так и лингвистические – возрастает грамотность и правильность речи при сохранности оценочной и эмоциональной окраски (*рис. 11*). Например, если в возрасте 9 лет, как мы уже видели (*рис. 3*), на просьбу нарисовать велосипед ребенок откликнулся изображением под-

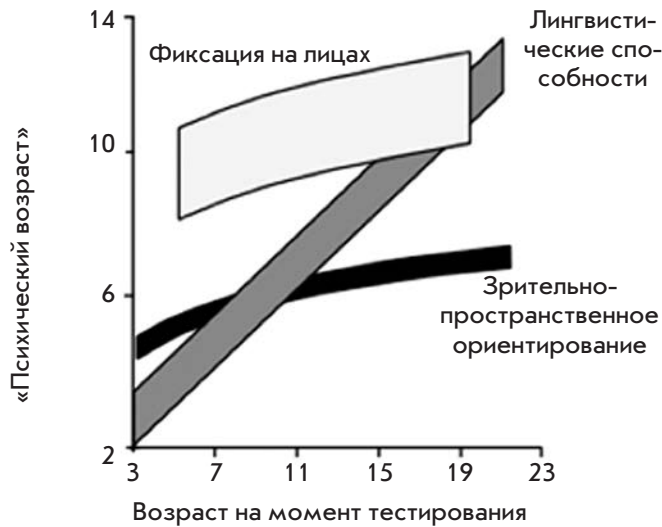


Рис. 11. Изменения трех основных когнитивных особенностей в зависимости от возраста пациентов с WBS [5]

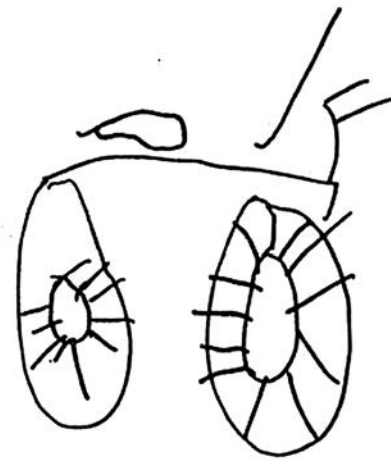


Рис. 12. Изображение велосипеда ребенком с WBS в возрасте 12 лет 11 месяцев [10]

писанных деталей, т.е. вычленил только части целого, то в возрасте 12 лет уже был способен осуществлять синтез целого из частей (рис. 12).

Поэтому изначальная убежденность в исключительной роли генов, напрямую определяющих путь к морфологии мозга и поведению, сменилась представлениями о необходимости поиска эпигенетических факторов пластичности мозга, влияющих на его развитие и функции, преломляемые в меняющемся поведении [40].

Это обстоятельство заставило по-иному относиться и к интерпретации, казалось бы, противоречивых данных. Напомним, что в большинстве случаев анализируют ограниченное число пациентов разного возраста – от начинающих ходить до 14- и 19-летних. Таким образом, четкая картина генетической детерминации начала жизни (один ген – один фермент – поведенческое проявление) накладывается на по-разному сложившиеся эпигенетические изменения действия гена в зависимости от пережитого социального (семейного и школьного) стресса и индивидуального опыта (обучения, условного рефлекса). Поэтому подкрепляемые данными ядерно-магнитного резонанса и современного brain-imaging по выявлению тех или иных зон мозга, активируемых при предъявлении тестовых для поведенческой триады заданий, исследования синдрома Уильямса устремились в русло индивидуального развития ребенка при его взаимодействии со средой [5].

Именно индивидуальное развитие любого организма, в том числе человека [41, 42], рассматрива-

ется в русле транзакционного анализа – транзакций (взаимодействий) между генотипом и средой. Предполагается, что биоповеденческие системы способны к адаптивной самоорганизации и самостабилизации за счет условного рефлекса, вырабатываемого на сигналы среды [43].

По современным представлениям транзакции такого рода и приводят к эпигенетическим изменениям. Своим становлением они обязаны не только уже известным явлениям – метилированию промоторов генов и ацетилованию гистонов, но и новому феномену – регуляции активности генов малыми некодирующими (нк) РНК.

Что касается первого аспекта, то эпигенетика изменений активности генов по мере взросления человека становится самостоятельной областью исследований [44]. Считается, что гены «включены», когда ДНК неметилирована, а гистоны ацетилированы, и, наоборот, гены «выключены», когда ДНК метилирована, а гистоны неацетилированы. Это динамичный процесс, зависящий от возраста, диеты, стресса [45].

Второй аспект непривычен и нов. Так, на наших глазах происходит взрыв исследований в направлении, противоречащем устоявшейся молекулярно-генетической парадигме. Обнаружено, что лишь 1.2% генов млекопитающих кодируют белковые продукты, остальная же часть генома генерирует различные классы нкРНК. Поэтому возникла новая парадигма [46], согласно которой известные классы нкРНК и те, что еще предстоит обнаружить, в норме и патологии

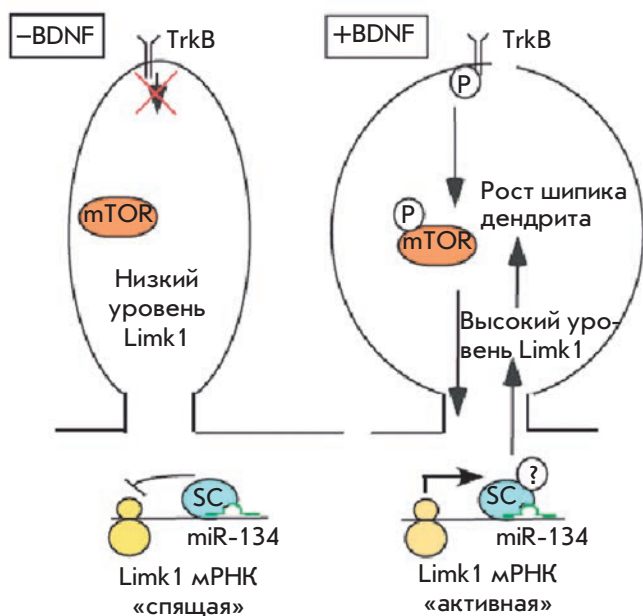


Рис. 13. miR-134 в регуляции локальной трансляции LIMK1 [49]. При отсутствии BDNF трансляция LIMK1 блокируется miR-134 опосредованно через сайленсинг-комплекс (SC), что ведет к уменьшению шипиков дендритов. В присутствии BDNF активируется трансляция LIMK1 и рост шипиков дендритов

обеспечивают регуляцию экспрессии генов, кодирующих белки.

Это взаимодействие двух «миров» – РНК и белков – является базой для гибкой взаимосвязи генов с окружающей средой, что очень существенно для функционирования нервной системы. Более того, нкРНК – это устройство для связи между цифровой информацией нуклеиновых кислот ядра и аналоговой информацией клеточных белков [47, 48].

Именно в нервной системе преимущественно представлены нкРНК, функции которых обеспечивают синаптическую пластичность – молекулярную основу формирования памяти. Если краткосрочная память (до 3 ч), т.е. память о том, что произошло только что, основана на модификации (в основном фосфорилировании) предсуществующих белков, то среднесрочная память (2–8 ч) зависит от нового синтеза белка на предсуществующих матричных РНК (мРНК), т.е. от регулируемой микроРНК локальной трансляции в далеко отстоящих от ядра нервной клетки дендритах и синапсах. Они участвуют в создании «молчащих» комплексов мРНК–микроРНК, удобных для транспорта из ядра в дендрит, для чего требуется аппарат самого транспорта – актин–тубулиновые микротрубочки дендритов. Регуляция дендритного

транспорта многих мРНК может осуществляться взаимодействием PDZ-доменов LIMK1 с тубулином микротрубочек [29]. Здесь уместно напомнить, что в становлении когнитивных и поведенческих проявлений синдрома Уильямса участвуют два гена, контролирующей функции цитоскелета за счет регуляции динамики актина (*limk1*) [37] и сети микротрубочек (*clip2*) [38]. К таким мРНК относятся матрицы для быстрого локального синтеза субъединиц глутаматных рецепторов, в частности NMDA и GluR, белков синаптических уплотнений (PSD), факторов транскрипции и компонентов сигнального каскада ремоделирования актина (LIMK1, кофилин). Широко цитируемый пример [49] – взаимодействие микроРНК miR-134 с мРНК белка LIMK1, ключевого фермента ремоделирования актина, для создания «молчащего» комплекса и локальная трансляция в дендритах мРНК белка LIMK1 в ответ на нейрональную активность (рис. 13). miR-134 частично комплементарна 3'-нетранслируемой области мРНК LIMK1 (3'UTR).

микроРНК – это наиболее интенсивно изучаемый класс нкРНК длиной 20–30 нуклеотидов, действующих по принципу РНК-интерференции. Источником малых РНК является гетерохроматин – ключевой фактор эпигенетической регуляции экспрессии генов, поведения хромосом, функций нервной системы в норме и патологии, а также в эволюционных преобразованиях [50]. Модификации хроматина скоординированы с активацией каскадов транскрипции при синаптической пластичности и связаны непосредственно с CREB-зависимыми сигнальными путями.

Для изучения этого нового феномена требуются и новые модели. В этой связи возникает ряд вопросов.

Возможно ли, абстрагируясь от эпигенетических факторов сложного индивидуального развития мозга от младенчества до юности (применительно к человеку) или постнатального развития (применительно к мышам), найти и создать достаточно простые системы для анализа вклада как отдельного гена, так и последствий его эпигенетической регуляции в становление когнитивного профиля при синдроме Уильямса? Можно ли в этих целях использовать дрозофилу?

***Drosophila melanogaster* КАК ВОЗМОЖНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПУТИ ГЕНЫ–МОЗГ–СОЗНАНИЕ: ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА**

С одной стороны, функции так называемых патологических генов человека часто устанавливаются по характеру проявления мутаций в этом же гене дрозофилы, если его последовательность такая же, как и у гена человека. С другой стороны, все гены, в геноме млекопитающих собранные в одном критическом районе (напомним, что ген *frizzled-9*, вхо-

дящий в область делеции при синдроме Уильямса, впервые описан у дрозофилы), у дрозофилы разбросаны по разным хромосомам. Несмотря на другой способ эволюционной организации, т.е. иной локализации генов, которые у млекопитающих оказываются сцепленными, такой подход к анализу действия конкретного гена в генезе синдрома Уильямса возможен при следующих условиях:

1) должны быть известны мутации данного гена, а его гемизиготность приводит к проявлению мутантного фенотипа у дрозофилы;

2) архитектура района хромосомы, в который локализован ген дрозофилы, может predispose к возникновению хромосомных перестроек за счет неравной рекомбинации;

3) в районе локализации гена зарегистрирована повышенная частота рекомбинации, что может приводить к спонтанной генерации делеций или других перестроек;

4) линии дикого типа характеризуются специфичным для данного района полиморфизмом.

Всем этим условиям удовлетворяет обнаруженный и охарактеризованный нами локус *agnostic* *D. melanogaster*, несущий ген белка LIMK1.

Локус *agnostic*

Локус *agnostic* был обнаружен в районе 11В X-хромосомы *D. melanogaster* при целенаправленном скрининге температурочувствительных (*ts*) мутаций, индуцированных этилметансульфонатом (ЭМС) в линии *Canton-S* (*CS*) и способных нарушать активность ферментов синтеза и распада сАМР [51].

Мутант *agn^{ts3}* по этому локусу имеет необычайно высокую активность Ca²⁺/кальмодулинзависимой фосфодигстеразы *Pde1* [52].

Молекулярно-генетическое изучение локуса позволило выявить фрагмент ДНК размером 21 т.п.н., который попадает в район, обнажаемый делециями, субклонировать содержащиеся в нем *EcoRI*-фрагменты размером 7, 5 и 9 т.п.н. и определить их концевые нуклеотидные последовательности.

В ходе этой работы при помощи гибридизации по Саузерну показано, что линии дикого типа *Canton-S* (*CS*), *Berlin* и *Oregon-R* (*OR-R*) характеризуются ярко выраженным полиморфизмом именно по данному району. Результаты биоинформатического анализа позволили расположить эти фрагменты в пределах отрезка АЕ003489 из района 11В X-хромосомы дрозофилы (рис. 14).

Оказалось, что эта область, попадающая как в известную делецию *Df(1)368*, так и в полученную нами узкую делецию *Df(1)112*, содержит ген белка LIMK1, гомологичный у огромного числа видов, в том числе у человека.

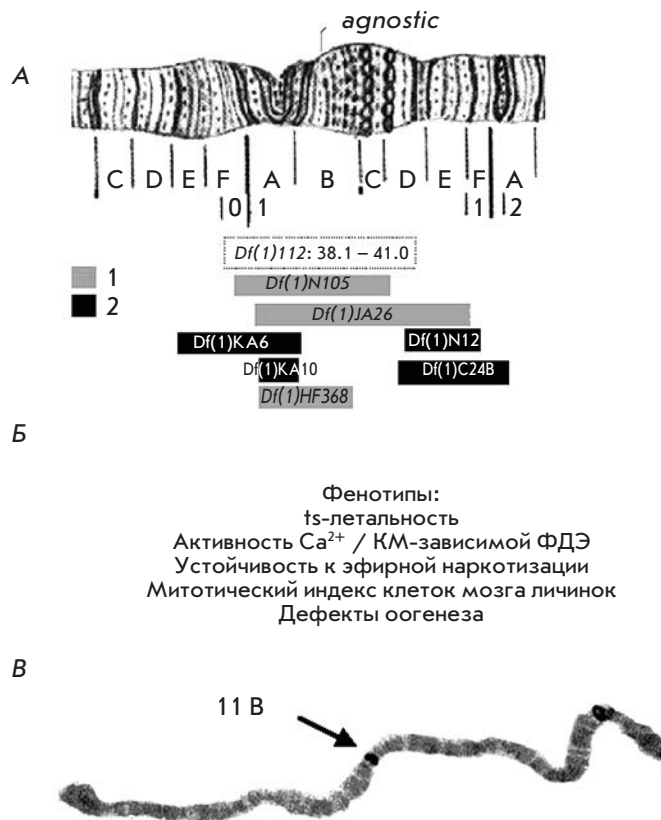


Рис. 14. Локализация локуса *agnostic* в пределах X-хромосомы [54]. А – картирование методом перекрывающихся делеций. Длина прямогольничков (за исключением микроделеции *Df(1)112*, для которой приведены границы рекомбинационного картирования) показывает протяженность в X-хромосоме делеций, обнажающих (1) и не обнажающих (2) проявление мутантных фенотипов (Б) по локусу *agnostic*. В – гибридизация *in situ* ДНК Р-элемента с политенными хромосомами Р-инсерционного мутанта *P40*

Данные нашего биоинформационного анализа выявляют гомологию локуса *agnostic*, преимущественно *EcoRI*-фрагмента 5 т.п.н., с тремя известными формами LIM-киназ разных видов позвоночных [53, 54].

В условиях гемизиготности – *Df(1)112/CS* – наблюдается проявление мутантных фенотипов *agn^{ts3}*, например, высокий уровень активности Ca²⁺/кальмодулинзависимой киназы *Pde1* и негомологичной конъюгации хромосом. Показано [53, 54], что район гена *agnostic* содержит повторяющиеся последовательности как внутри (повтор из двух LIM-доменов), так и вокруг гена. Ген обрамлен протяженными АТ-богатыми повторами (The National Centre for Biotechnology Information, NCBI), поэтому, возможно, именно негомологичным кроссинговером обусловлен

ОБЗОРЫ

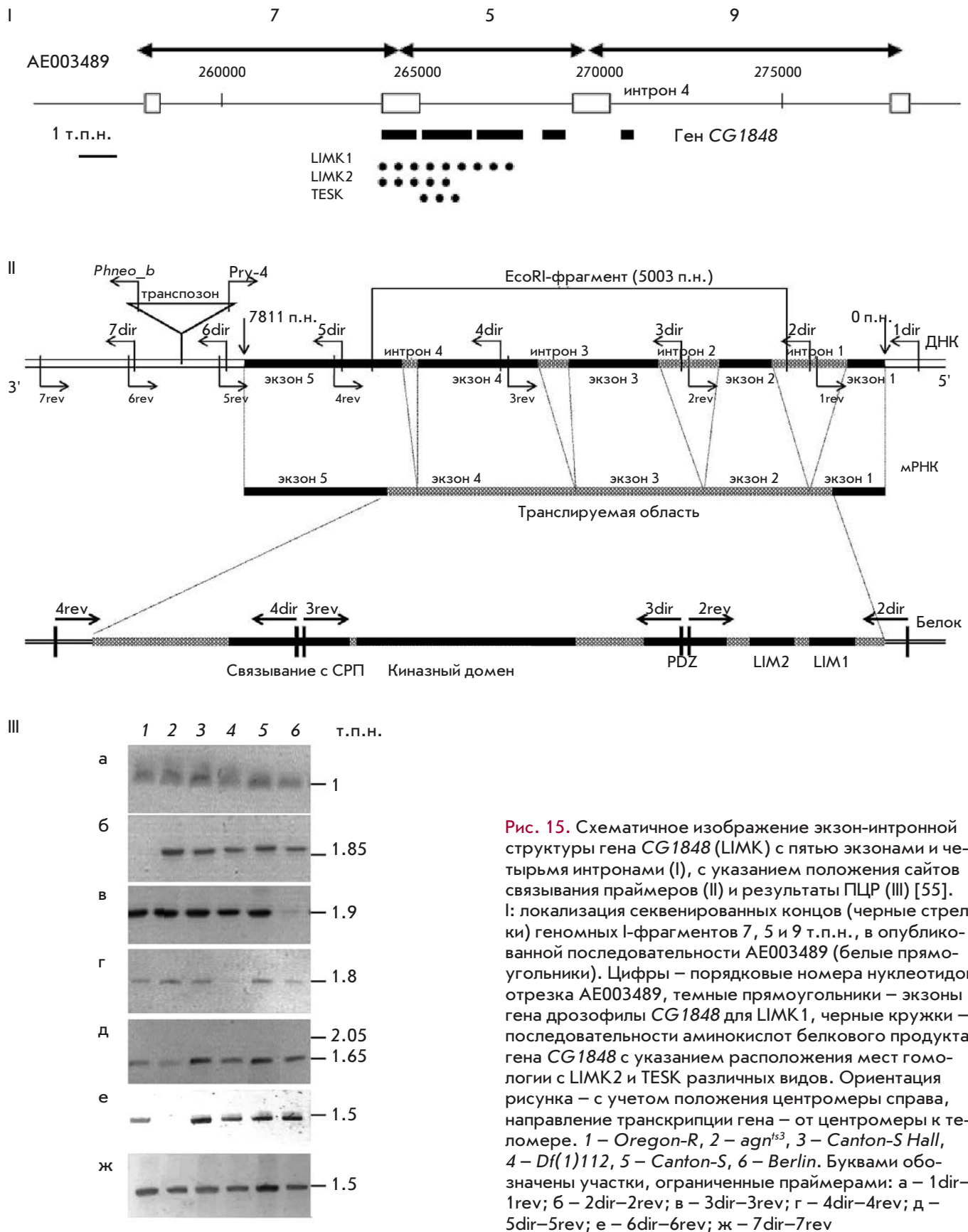


Рис. 15. Схематичное изображение экзон-интронной структуры гена CG1848 (LIMK) с пятью экзонами и четырьмя интронами (I), с указанием положения сайтов связывания праймеров (II) и результаты ПЦР (III) [55]. I: локализация секвенированных концов (черные стрелки) геномных I-фрагментов 7, 5 и 9 т.п.н., в опубликованной последовательности AE003489 (белые прямоугольники). Цифры – порядковые номера нуклеотидов отрезка AE003489, темные прямоугольники – экзоны гена дрозофилы CG1848 для LIMK1, черные кружки – последовательности аминокислот белкового продукта гена CG1848 с указанием расположения мест гомологии с LIMK2 и TESK различных видов. Ориентация рисунка – с учетом положения центромеры справа, направление транскрипции гена – от центромеры к теломере. 1 – Oregon-R, 2 – agn^{ts3}, 3 – Canton-S Hall, 4 – Df(1)112, 5 – Canton-S, 6 – Berlin. Буквами обозначены участки, ограниченные праймерами: а – 1dir-1rev; б – 2dir-2rev; в – 3dir-3rev; г – 4dir-4rev; д – 5dir-5rev; е – 6dir-6rev; ж – 7dir-7rev

высокий полиморфизм спонтанных и мутантных аллелей этого гена (рис. 15), показанный Д.А. Молотковым методом ПЦР [55].

Таким образом, ген *agnostic* в силу своего строения и окружения может служить генетическим резервом полиморфизма и быть удобной моделью геномных болезней, таких, как синдром Уильямса. В районе локализации гена *agnostic* частота кроссинговера повышена в 3 раза по сравнению с контролем. При этом наибольшие показатели числа двойных обменов, отрицательной интерференции и нерцепрокных комплементарных кроссоверных классов наблюдаются при температурном воздействии (29°C) в конце эмбриональной – начале личиночной стадии развития, а не на стадии премейотического синтеза ДНК (поздняя личинка III-куколка).

Это свидетельствует о том, что мутация влияет не собственно на кроссинговер, а на его предпосылки, изменяя конъюгационные особенности хромосом.

Саузерн-блот-анализ геномной ДНК выявляет у мутантов *agn^{ts3}* дополнительный Sall-фрагмент длиной 11 т.п.н. Поэтому возникло предположение об увеличении частоты обменов за счет неравного кроссинговера, вследствие чего Sall-фрагмент появляется у мутанта *agn^{ts3}*, предположительно, за счет инсерции или дупликации.

При ПЦР-картировании у мутанта *agn^{ts3}* в регуляторной области гена *limk1* действительно обнаружена инсерция 1.7 т.п.н., расположенная на расстоянии приблизительно 1 т.п.н. ниже 3'UTR.

Место встройки этой инсерции хорошо согласуется с определенным по базе данных AT-богатым районом, способным образовывать шпильку в одноцепочечной конформации и структуру тrefового креста в двухцепочечной конформации. Мы предполагаем, что эта аномальная структура не только может служить местом предпочтительного встраивания природного транспозона, но и способна образовывать при ее транскрипции микроРНК со сложной вторичной структурой, напоминающие по своим свойствам miR-134. Возможность участия таких микроРНК позволяет объяснить многие аспекты регуляции действия гена [55].

Для гена *agnostic* характерно следующее:

1. Иммунофлуоресцентное изучение распределения в зонах мозга дрозофилы LIMK1, ключевого фермента сигнального каскада ремоделирования актина, выявляет его преимущественную локализацию в центральном комплексе мозга и в зрительной системе. Мутационно обусловленное повреждение гена *limk1* (у *agn^{ts}*) приводит к резкому увеличению активности LIMK1 во всех зонах мозга. К такому же эффекту у мух дикого типа *Canton-S* приводит воздействие температуры.

2. Гемизиготное состояние гена *limk1* у дрозофилы, как и при синдроме Уильямса у человека, приводит к изменению распределения LIMK1 в зонах мозга. Фермент локализуется исключительно в зрительной системе и теряет зависимость от температурного воздействия.

3. Иммунофлуоресцентное изучение распределения LIMK1 и фосфорилируемого этим ферментом кофилина (p-кофилина) в клетках слюнных желез личинок дрозофилы выявляет их преимущественно цитоплазматическую локализацию у мух дикого типа. Тепловой шок вызывает перемещение компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в ядро и приводит к резкому увеличению активности LIMK1 и p-кофилина. Мутационно обусловленное повреждение гена LIMK1 (мутация *agn^{ts}*) увеличивает содержание и активность LIMK1, что снимается воздействием теплового шока.

4. Мутационное повреждение гена *limk1* (ЭМС- и Р-инсерционные мутации по локусу *agnostic*) влияет на конъюгационные свойства хромосом у дрозофилы: резко увеличивается частота формирования эктопических контактов районами интеркалярного гетерохроматина в политенных хромосомах слюнных желез. Гемизиготность по гену, как при синдроме Уильямса у человека, воспроизводит мутантный фенотип.

5. Ген *agnostic* вовлечен в механизмы гомологичного синапсиса хромосом, что выражается в резком снижении частоты асинапсиса в линии *agn^{ts3}* и аномалиях распределения длинных и коротких асинапсисов по длине хромосомы. Это указывает на различия локализации в ядре хромосомных плеч относительно друг друга у дикого типа и у *agn^{ts3}*, т.е. на разные способы формирования пространственной трехмерной организации ядра.

6. Мутационно обусловленные нарушения сигнального каскада ремоделирования актина приводят к формированию амилоидоподобных агрегатов в мозге имаго и в личиночных тканях всех особей *agn^{ts3}*. Частота встречаемости агрегатов снижается до уровня нормы после теплового шока. Это коррелирует со способностью к обучению и формированию памяти. Повышенная экспрессия LIMK1 у мутантов сопровождается значительным снижением обучаемости и среднесрочной памяти, выявляемых при условно-рефлекторном подавлении ухаживания самцов. Метод основан на естественных для полового поведения дрозофилы стимулах [56].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокая частота появления делеционно-дупликационных синдромов, к которым относится и синдром Уильямса, привела к формированию концепции

«геномных болезней», позволяющая напрямую связать гены, мозг, поведение и когнитивные функции. Четкость и дискретность когнитивных проявлений способствовали выявлению ключевого гена, ответственного за когнитивную составляющую синдрома, – гена *limk1*. Необходимость изучения внутригеномных резервов появления синдрома – кластеров повторяющихся последовательностей, распределение этих районов по зонам различной конформации в хромосоме и создание определенной организации ядра, в которой достигается пространственное сближение функционально и структурно связанных районов хромосом, – послужила поводом создания животных моделей. В частности, при изучении локуса *agnostic* для LIMK1 дрозофилы выявлено наличие повторяющихся последовательностей в области гена, мутантное проявление которого связано с изменениями в конъюгационных свойствах хромосом и трехмерной организации ядра, что является уже эпигенетической производной мутационного повреждения.

На генетическом языке, при анализе мутантных и спонтанных вариантов локуса *agnostic* вырисовывается следующая цепь событий: внешний сигнал – активация LIMK1 – фосфорилирование кофиллина – состояние актина – нормальные когнитивные

способности или патологическая потеря памяти, сопровождаемая формированием конгофильных (амилоидных) отложений.

Таким образом, можно полагать, что мутантная линия *agn^{ts3}* является моделью синдрома Уильямса на дрозофиле. Выявленная связь мутационного повреждения гена *limk1*, изменение экспрессии и активности LIMK1, наличие амилоидоподобных включений и нарушений в когнитивной сфере позволяют применять данную модель для изучения как нейродегенеративных заболеваний, так и геномных болезней. Наличие природных полиморфных вариантов в гене *limk1* дает возможность использовать их как инструмент при изучении нейродегенеративных заболеваний, которые в большинстве случаев возникают спонтанно под действием неблагоприятных факторов окружающей среды. Возможности применения описанного инструментария составляют предмет специальных экспериментальных исследований, проводимых в нашей лаборатории [57]. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-01737-а), программами
Президиума РАН (№ 7 и 30).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Williams J.C., Barratt-Boyes B.G., Lowe J.B. // *Circulation*. 1961. V. 24. P. 1311–1318.
- Beuren A.J., Apitz J., Harmjan D. // *Circulation*. 1962. V. 26. P. 1235–1240.
- Pober B.R., Johnson M., Urban Z. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. № 5. P. 1606–1615.
- Bellugi U., Adolphs R., Cassady C., Chiles M. // *Neuroreport*. 1999. V. 10. № 8. P. 1653–1657.
- Järvinen-Pasley A., Bellugi U., Reilly J., Mills D.L., Galaburda A., Reiss A.L., Korenberg J.R. // *Dev. Psychopathol.* 2008. V. 20. № 1. P. 1–35.
- Carrasco X., Castillo S., Aravena T., Rothhammer P., Aboitiz F. // *Pediatr. Neurol.* 2005. V. 32. № 3. P. 166–172.
- Gagliardi C., Martelli S., Burt M.D., Borgatti R. // *Pediatr. Neurol.* 2007. V. 36. № 5. P. 301–306.
- Tassabehji M. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 229–237.
- Nakamura M., Mizuno S., Douyuu S., Matsumoto A., Kumagai T., Watanabe S., Kakigi R. // *Pediatr. Neurol.* 2009. V. 41. № 2. P. 95–100.
- Mervis C.B., Robinson B.F., Pani J.R. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. № 5. P. 1222–1229.
- Doherty-Sneddon G., Riby D.M., Calderwood L., Ainsworth L. // *Cogn. Neuropsychiatry*. 2009. V. 14. № 6. P. 510–523.
- Thorton-Wells T.A., Cannistraci C.J., Anderson A.W., Kim C.Y., Eapen M., Gore J.C., Blake R., Dykens E.M. // *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 2010. V. 115. № 2. P. 172–189.
- Chen K.S., Mnian P., Koeuth T., Potocki L., Zhao Q., Chinault A.C., Lee C.C., Lupski J.R. // *Nat. Genet.* 1997. V. 17. P. 154–163.
- Shaikh T.H., Kurahashi H., Saitta S.C., O'Hare A.M., Hu P., Roe B.A., Driscoll D.A., McDonald-McGinn D.M., Zackai E.H., Budarf M.L., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. P. 489–501.
- Amos-Landgraf J.M., Ji Y., Gottlieb W., Depinet T., Wandstrat A.E., Cassidy S.B., Driscoll D.J., Rogan P.K., Schwartz S., Nichllos R.D. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. P. 370–386.
- Shaw C.J., Lupski J.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. P. 57–64.
- Lupski J.R. // *Trends Genet.* 1998. V. 14. P. 417–422.
- Bayes M., Magano L.F., Rivera N., Flores R., Perez-Jurado L.A. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. P. 131–151.
- Valero M.C., De Lues O., Cruses L., Perez-Jurado L.A. // *Genomics*. 2000. V. 69. P. 1–13.
- Osborne L.R., Li M., Pober B., Chitayat D., Bodurtha J., Mandel A., Costa T., Crebe T., Cox S., Tsui L.C., Scerer S.W. // *Nat. Genet.* 2001. V. 29. P. 321–325.
- Urban Z., Helms C., Fekete G., Csiszar K., Bonnet D., Munnich A., Donis-Keller H., Boyd C.D. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. 958–962.
- Weber E.J., Levenson J.M., Sweat J.D. // *Mol. Interventions*. 2002. V. 2. P. 376–391.
- Zhao C., Aviles C., Abel R.A., Almlı C.R., McQuillen P., Pleasure S.J. // *Development*. 2005. V. 132. P. 2917–2927.
- Zhang R., Maksymowych A.B., Simpson L.L. // *Gene*. 1995. V. 159. P. 293–294.
- Nakayama T., Matsuoka R., Kimura M., Hirota H., Mikoshiba K., Shimizu Y., Shimizu N., Akagawa K. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1998. V. 82. P. 49–51.
- Francke U. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. P. 1947–1954.
- Tassabehji M., Metcalfe K., Fergusson W.D., Carette M.J.A., Dore J.K., Donnai D., Read A.P., Proschel C., Gutowski N.J., Mao X., Sheer D. // *Nat. Genet.* 1996. V. 13. P. 272–273.
- Arber S., Barbayannis F.A., Hansen H., Schneider C., Stanyon C.A., Bernard O., Caroni P. // *Nature*. 1998. V. 393. P. 805–809.

29. Scott R.W., Olson M.F. // *J. Mol. Med.* 2007. V. 85. P. 555–568.
30. Gorovoy M., Niu J., Bernard O., Profirovic J., Minshall R., Neamu R., Voyno-Yasenetskaya T. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 28. P. 26533–26542.
31. Yang H., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. // *Nature.* 1998. V. 393. P. 809–812.
32. Frangiskakis J.M., Ewart A.K., Morris C.A., Mervis C.B., Bertrand J., Robinson B.F., Klein B.P., Ensing G.J., Everett L.A., Green E.D., et al. // *Cell.* 1996. V. 86. № 1. P. 59–69.
33. Tassabehji M., Metcalfe K., Karmiloff-Smith A., Carette M.J., Grant J., Dennis N., Reardon W., Splitt M., Read A.P., Donnai D. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 64. № 1. P. 118–125.
34. Morris C.A., Mervis C.B., Hobart H.H., Gregg R.G., Bertrand J., Ensing G.J., Sommer A., Moore C.A., Hopkin R.J., Spallone P.A., et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2003. V. 123A. № 1. P. 45–59.
35. Sakurai T., Dorr N.P., Takahashi N., McInnes L.A., Elder G.A., Buxbaum J.D. // *Autism Res.* 2011. V. 4. № 1. P. 28–39.
36. Osborne L.R. // *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 2010. V. 154C. № 2. P. 209–219.
37. Meng Y., Zhang Y., Tregoubov V., Janus C., Cruz L., Jackson M., Lu W.-Y., MacDonald J.F., Wang J.Y., Falls D.L., et al. // *Neuron.* 2002. V. 35. P. 121–133.
38. Hoogenraad C.C., Koekkoek B., Akhmanova A., Krugers H., Dortland B., Miedema M., van Alphen A., Kistler W.M., Jaegle M., Koutsourakis M., et al. // *Nat. Genet.* 2002. V. 32. P. 16–27.
39. Micale L., Fusco C., Augello B., Napolitano L.M.R., Dermitzakis E.T., Meroni G., Merla G., Raymond A. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. № 9. P. 1038–1049.
40. Karmiloff-Smith A. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 24. P. 1035–1036.
41. Germana J. // *Integr. Physiol. Behav. Sci.* 1996. V. 31. № 3. P. 210–218.
42. Scarr S., McCartney K. // *Child. Dev.* 1983. V. 54. № 2. P. 424–435.
43. Лобашев М.Е. Исследования по генетике. Вып. 1. Л.: Изд-во ЛГУ, 1961. С. 3–11.
44. Fraga M.F., Esteller M. // *Trends Genet.* 2007. V. 23. № 8. P. 413–418.
45. Poulsen P., Esteller M., Vaag A., Fraga M.F. // *Pediatr. Res.* 2007. V. 61. P. 38–42.
46. Mattick J.S. // *J. Exp. Biol.* 2007. V. 210. P. 1526–1547.
47. Mercer T.R., Dinger M.E., Mariani J., Kosik K.S., Mehler M.F., Mattick J.S. // *Neuroscientist.* 2008. V. 14. № 5. P. 434–445.
48. Savvateeva-Popova E., Popov A., Grossman A., Nikitina E., Medvedeva A., Molotkov D., Kamyshev N., Pyatkov K., Zatssepina O., Schostak N., et al. // *J. Neural. Transm.* 2008. V. 115. № 12. P. 1629–1642.
49. Schratz G.M., Tuebing F., Nigh E.A., Kane C.G., Sabatini M.E., Kiebler M., Greenberg M.E. // *Nature.* 2006. V. 439. № 7074. P. 283–289.
50. Lippman Z., Martienssen R. // *Nature.* 2004. V. 431. № 7006. P. 364–370.
51. Савватеева Е.В., Камышев Н.Г., Розенблюм С.Р. // ДАН СССР. 1978. Т. 240. С. 1443–1445.
52. Savvateeva E.V., Kamyshev N.G. // *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 1981. V. 14. P. 603–611.
53. Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Токмачева Е.В., Медведева А.В., Камышев Н.Г., Попов А.В., Озерский П.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2002. Т. 38. № 6. С. 557–577.
54. Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Медведева А.В., Корочкина С.Е., Григорьева И.В., Дюжикова Н.А., Попов А.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 749–769.
55. Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.А., Карагодин Д.А., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. // Генетика. 2008. Т. 44. № 6. С. 669–681.
56. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. // *Learn. & Mem.* 1999. V. 6. P. 1–20.
57. Medvedeva A.V., Zhuravlev A.V., Savvateeva-Popova E.V. // *Horizons in Neurosci. Resh.* 2010. V. 1. Ch. 4. P. 161–193.

УДК 577.1

Молекулярные механизмы действия системы общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов

И. О. Петрусева¹, А. Н. Евдокимов^{1,2}, О. И. Лаврик^{1,2,3*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8²Алтайский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

Поступила в редакцию 31.10.2013

РЕФЕРАТ Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) в клетках высших эукариот – многостадийный процесс, с помощью которого распознаются и удаляются из ДНК повреждения, вызывающие заметные нарушения ее регулярной структуры, такие, как УФ-повреждения и объемные химические аддукты. В клетках высших эукариот NER – универсальный путь удаления объемных повреждений. Нарушения в работе системы NER ассоциированы с появлением симптомов таких заболеваний, как пигментная ксеродерма, синдром Коккейна и трихотиодистрофия, которые характеризуются повышенной чувствительностью к УФ-облучению и высокой предрасположенностью к онкологическим заболеваниям (в случае пигментной ксеродермы), а также множественными системными неврологическими и иммунологическими аномалиями. Система NER эукариот удаляет из поврежденной цепи ДНК 24–32-звенные фрагменты с последующим восстановлением интактной двойной спирали с помощью репаративного синтеза и лигирования. В процесс NER вовлечено примерно 30 полипептидов. Существуют две ветви NER – репарация, сопряженная с транскрипцией (TCR), и общегеномная репарация (GGR), различающиеся типом белка-сенсора, который осуществляет первичное узнавание повреждения. В данном кратком обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе процессов узнавания повреждений и их удаления из ДНК млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярные механизмы узнавания и удаления повреждений; факторы репарации; эксцизионная репарация нуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) – один из основных путей защиты клетки от различных структурно и химически различающихся повреждений ДНК. Эти повреждения представляют собой, как правило, объемные ковалентные аддукты, сформированные азотистыми основаниями в результате воздействия УФ-света, ионизирующих излучений, электрофильных химических мутагенов, некоторых лекарственных препаратов, а также химически активных эндогенных метаболитов, включая реакционноспособные производные кислорода и азота [1]. В клетках высших эукариот система NER с высокой точностью удаляет из ДНК 24–32-звенные фрагменты, содержащие поврежденное звено. Последующий репаративный синтез с использованием неповрежденной цепи в ка-

честве матрицы и лигирование возникшего одноцепочечного разрыва завершают процесс репарации ДНК. Идентифицированы основные гены, инактивированные в дефектных по NER клетках, определены кодируемые ими белковые факторы и ферменты. Известно, что процесс осуществляется за счет координированной работы примерно 30 белков, последовательно формирующих на ДНК комплексы переменного состава [1–3]. Выделяют два варианта NER, различающихся на уровне начального узнавания повреждения. GG-NER (global genome nucleotide excision repair) осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин. TC-NER – репарация, сопряженная с транскрипцией (transcription-coupled nucleotide excision repair), происходит, когда повреждение транскри-

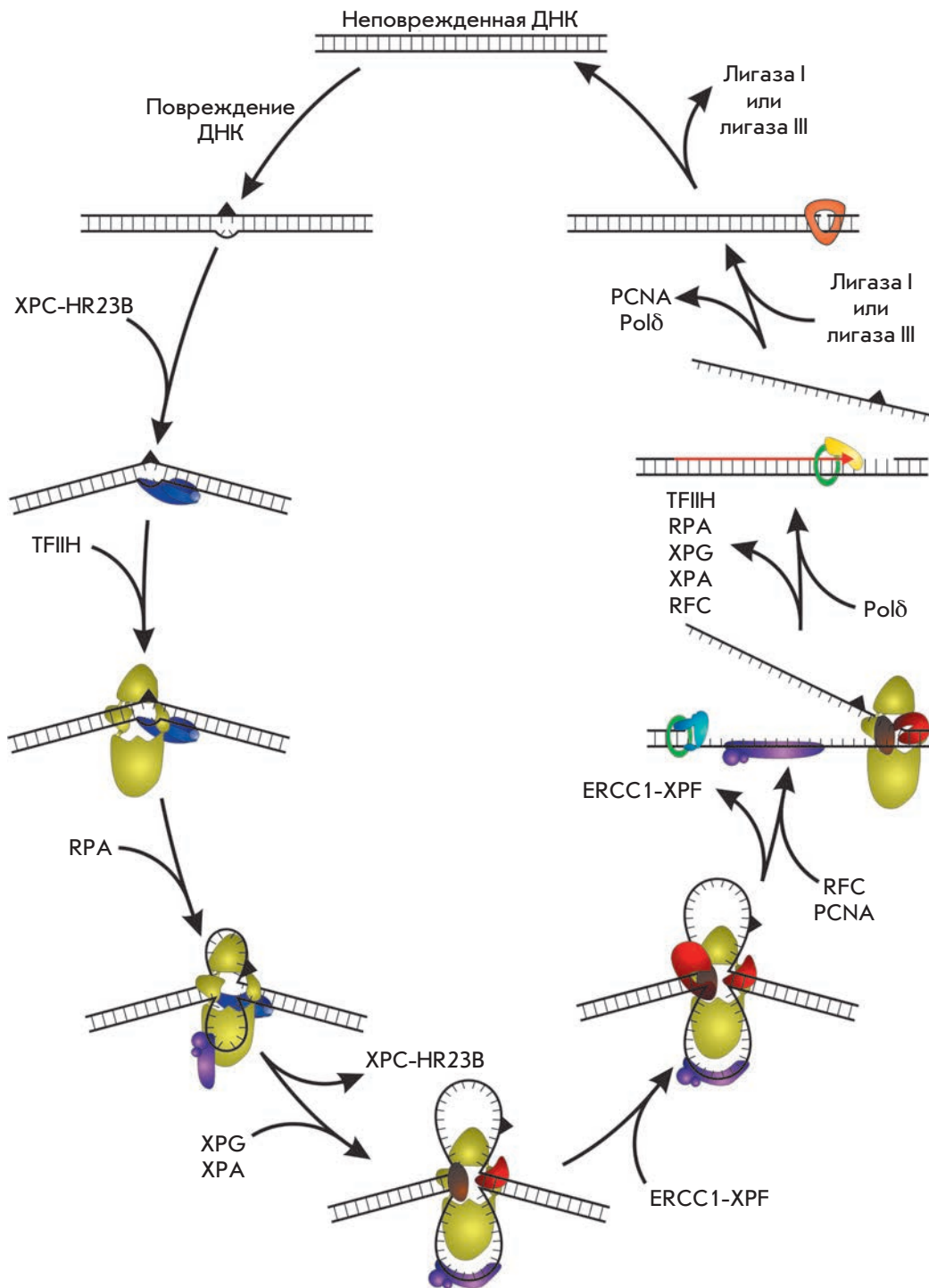


Рис. 1. Схема процесса общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов

бируемой цепи ДНК ограничивает транскрипционную активность. TC-NER инициируется остановкой РНК-полимеразы II при встрече с повреждением, расположенным в транскрибируемой цепи, в то время как за обнаружение повреждений в процессе GG-NER отвечает специализированный белковый фактор XPC. На рис. 1 представлена схема процесса

GG-NER. Данные об основных белках – участниках процесса NER, представлены в таблице.

Нарушения в работе системы NER приводят к возникновению нескольких патологических состояний – пигментной ксеродермы (Xeroderma Pigmentosum, XP), синдрома Коккейна (CS) и трихотриодистрофии (TTD), для которых характерны

Белки, участвующие в процессе NER, и их функции

Фактор	Субъединица	Ген	Масса, кДа / (размер, а.о.)	Функция, выполняемая в процессе NER	Взаимодействие с другими факторами
ХРС	HR23В	<i>hhr23b</i>	43 / (409)	Узнавание искаженной структуры ДНК	ТФИИ ХРА DDB
	ХРС	<i>xpc</i>	125 / (940)		
	CEN2	<i>cen2</i>	20 / (172)		
DDB	DDB1	<i>ddb1</i>	127 / (1140)	Узнавание повреждения, взаимодействие с хроматином	ХРС RPA
	DDB2	<i>ddb2</i>	48 / (428)		
ХРА	ХРА	<i>xpa</i>	31 / (273)	Структурная функция, связывание с поврежденной цепью	ХРА RPA ТФИИ ERCC1
RPA	RPA70	<i>rpa1</i>	68 / (616)	Связывание одноцепочечной ДНК	ХРА XPG PCNA/RFC
	RPA32	<i>rpa2</i>	30 / (270)		
	RPA14	<i>rpa3</i>	14 / (121)		
ТФИИ	ХРВ	<i>xpb</i>	89 / (782)	АТР-аза, минорная хеликазная активность 3'→5'-ДНК-хеликаза	ХРА ХРС ХРФ ХРГ
	ХРД	<i>xpd</i>	87 / (760)	АТР-зависимая 5'→3'-ДНК-хеликаза; проверка наличия модификации	
	p62	<i>gtf2h1</i>	62 / (548)	Коровая субъединица, стимулирует ХРВ	
	p44	<i>gtf2h2</i>	44 / (395)	Коровая субъединица, стимулирует ХРД	
	p34	<i>gtf2h3</i>	34 / (308)	Связывание ДНК	
	p52	<i>gtf2h4</i>	52 / (462)	Регуляторная субъединица для АТР-азной активности ХРВ, функционирующей в комплексе ТФИИ	
	p8	<i>gtf2h5 (ttda)</i>	8 / (71)	Взаимодействие с p52, стимуляция АТР-азной активности ХРВ	
	Mat1	<i>mnat1</i>	36 / (309)	Входит в состав САК-комплекса	
	Cdk7	<i>cdk7</i>	39 / (346)	Фосфорилирует РНК-полимеразу II и другие субстраты	
Циклин Н	<i>ccnh</i>	38 / (323)	Регуляция клеточного цикла		
ХРФ	ERCC1	<i>ercc1</i>	33 / (297)	Эндонуклеаза, катализирует образование одноцепочечного разрыва в ДНК с 5'-стороны от повреждения	ХРА ТФИИ
	ХРФ	<i>xpf</i>	103 / (905)		
ХРГ	ХРГ	<i>xpg</i>	133 / (1186)	Эндонуклеаза, катализирует образование одноцепочечного разрыва в ДНК с 3'-стороны от повреждения	ТФИИ RPA PCNA
RFC	RFC1	<i>rfc1</i>	128 / (1148)	АТР-зависимое присоединение PCNA	PCNA RPA
	RFC2	<i>rfc2</i>	39 / (354)		
	RFC3	<i>rfc3</i>	41 / (356)		
	RFC4	<i>rfc4</i>	40 / (363)		
	RFC5	<i>rfc5</i>	38 / (340)		
PCNA	PCNA	<i>pcna</i>	3x37 / (3x261)	Фактор, обеспечивающий процессивность ДНК-полимераз	RFC XPG Polδ
Polδ	p125	<i>p125</i>	124 / (1107)	ДНК-полимераза	PCNA
	p66	<i>p66</i>	51 / (466)		
	p50	<i>p50</i>	51 / (469)		
	p12	<i>p12</i>	12 / (107)		
Polε	p261	<i>p261</i>	261 / (2286)	ДНК-полимераза	PCNA
	p59	<i>p59</i>	60 / (527)		
	p17	<i>p17</i>	17 / (147)		
	p12	<i>p12</i>	12 / (117)		
Лигаза I	Ligase I	<i>ligI</i>	102 / (919)	Лигирование одноцепочечного разрыва	
Лигаза III	Ligase III	<i>ligIII</i>	103 / (862)		

УФ-чувствительность и высокий риск развития онкологических заболеваний, а также к ряду нейродегенеративных проявлений [4–6].

С латинским названием пигментной ксеродермы (*Xeroderma Pigmentosum*) связаны обозначения ряда генов, мутации и нарушение работы которых приводят к появлению симптомов заболевания, а также названия кодируемых этими генами белков (факторы ХРА–ХРЕ). ХР – синдром, характеризующийся фоточувствительностью, атрофией кожи, ее гиперпигментацией и высокой частотой возникновения индуцированного солнечным светом рака кожи. У больных ХР повышен (по крайней мере, в 1000 раз) риск развития опухолей внутренних органов [6, 7]. Кроме того, заболевание часто ассоциировано с неврологическими нарушениями. Различные симптомы, наблюдаемые при ХР, характерны для пожилых людей, и отражают преждевременное старение, обусловленное накоплением нерепарированных объемных повреждений ДНК, в том числе некоторых окислительных [8–10].

УЗНАВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Распознавание повреждения – ключевая стадия в инициации NER, определяющая скорость репарации [1, 2, 11]. К общим признакам, необходимым для первичного узнавания повреждения системами репарации, относятся искажение регулярной структуры двухцепочечной ДНК (дцДНК) и изменение ее стабильности. Наиболее часто системой эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований (base excision repair, BER) удаляются химические модификации азотистых оснований. Для NER наиболее характерно удаление из состава ДНК возникающих в результате УФ-облучения продуктов фотосшивок соседних пиримидиновых оснований, платиновых аддуктов, сшивок белок–ДНК, модификаций, вызванных взаимодействием с ДНК активных производных бенз[а]пирена, бензо[с]антрацена, ацетиламинофлуорена, а также других объемных аддуктов, в большей степени нарушающих регулярную двухцепочечную структуру ДНК, чем повреждения, репарируемые системой BER [12]. Тем не менее большинство субстратов эксцизионных систем репарации не вносят столь драматических структурных и термодинамических изменений в дцДНК, как двухцепочечные разрывы и межцепочечные сшивки. Поэтому выявление таких повреждений представляет специальную задачу для клетки, решение которой требует функционирования высокочувствительного механизма их распознавания. В отличие от BER, где узнавание и одновременно удаление поврежденного основания производит специализированная гликозилаза, в случае NER узнавание повреждения и его

удаление осуществляют разные белки. Функции первичного узнавания всего спектра объемных повреждений в эукариотической системе NER выполняют универсальные белки-сенсоры. В случае TC-NER это остановленная у повреждения транскрибирующая РНК-полимераза II; в GG-NER – комплексы фактора ХРС и гетеродимер DDB1-DDB2 (фактор ХРЕ), ускоряющий репарацию УФ-повреждений [1, 2]. В целом распознавание повреждения в NER – сложный организованный процесс, в котором выделяют несколько этапов, осуществляемых целым набором белков, образующих в районе повреждения комплексы переменного состава. Процесс завершается формированием комплекса, готового к удалению поврежденного участка ДНК с помощью специализированных эндонуклеаз NER [1, 2].

Главный фактор, обеспечивающий стабильность регулярной спиральной структуры двухцепочечной ДНК, – комплементарные взаимодействия оснований. Объемное повреждение приводит к нарушению спаривания оснований и появлению в молекуле дцДНК флуктуирующего «одноцепочечного» участка (в англоязычной литературе определяется как «single stranded character»). Неповрежденная ДНК также не является статичной молекулой. Цепи ДНК находятся в постоянном тепловом движении, что обеспечивает небольшие быстрые изменения расстояния между комплементарными основаниями. Однако эти пико- и наносекундные колебания, существующие в отсутствие повреждения, вероятно, слишком кратковременны для того, чтобы их могли распознать факторы репарации. Методом молекулярного моделирования показано, что введение в ДНК объемного повреждения может приводить к появлению более существенных и долгоживущих «раскрытий» двойной спирали [13, 14]. Например, в районе циклобутанпиримидинового димера такие флуктуации в структуре ДНК возникают в 25 раз более часто, нежели в неповрежденном дуплексе. Кроме того, радикально возрастает амплитуда колебаний, так как нарушается взаимодействие между комплементарными цепями ДНК. Динамические изменения, возникшие в результате повреждения основания, вызывают, главным образом, колебания участка неповрежденной цепи, комплементарного участку, содержащему повреждение, в то время как поврежденный фрагмент ДНК менее подвижен [15, 16]. Такие колебания могут служить сигналом для привлечения факторов репарации, осуществляющих начальный этап узнавания повреждения. О важной роли, которую в процессе узнавания играет интактная цепь ДНК, свидетельствовали также результаты ряда экспериментов, в частности, анализа эффективности специфической эксцизии с использованием модельных ДНК различ-

ной структуры, позволившие сформулировать концепцию о двухэтапном или состоящем из двух частей («bipartite») процессе узнавания в NER [15, 16]. Было показано, что белки системы NER, присутствующие в клеточном экстракте, могут инициировать репарацию в том случае, когда модельная ДНК содержит химическую модификацию и нарушение вторичной структуры. Так, например, эксцизия участка, содержащего объемный, но не нарушающий регулярную структуру ДНК-дуплекса С4'-пивалоильный аддукт дезоксирибозы, происходила только в том случае, когда он располагался в месте искусственно созданного короткого участка нарушения спаривания. Участки неспаренных оснований, не содержащие модификации, не являются субстратами специфической эксцизии, как не являются субстратами и структуры, содержащие химическую модификацию, введенную напротив петли, образованной немодифицированной цепью [16].

Поиску белков, ответственных за первичное узнавание повреждения и дальнейшее привлечение последующих факторов NER, посвящено большое число исследований. Хотя доказательства ключевой роли XPC в инициации NER появились достаточно [17–19], результаты оценки сродства к поврежденной ДНК и анализа специфичности связывания с поврежденным субстратом позволяли отводить роль сенсора фактору XPA и его комплексам с RPA и XPC [20–23]. С применением конфокальной микроскопии и несущих флуоресцентную метку белков показали, что XPC иммобилизуется в местах УФ-повреждений и в отсутствие XPA (XPA-дефектные клетки), тогда как в XPC-дефектных клетках XPA не связывается с поврежденными участками ДНК [3, 18]. Согласно биохимическим исследованиям, присутствие XPC необходимо для вовлечения остальных факторов в процесс GG-NER [17, 19, 24]. Для выяснения механизма первичного узнавания повреждения, которое XPC осуществляет на фоне огромного количества интактной ДНК, были применены различные подходы, в том числе методы визуализации, позволяющие следить за перемещением флуоресцентных белков в контексте хроматина в живой клетке. С использованием подхода FRAP/FLIP (fluorescence recovery after photobleaching/fluorescence loss in photobleaching) было показано, что динамика перемещений и способ внутриядерной локализации GFP-XPC отличаются от динамики и локализации других факторов NER (GFP-XPA, TFIIH-GFP). XPC постоянно сканирует геномную ДНК в поисках повреждений. Сканирование происходит в режиме ассоциации-диссоциации с формированием множества короткоживущих комплексов. При встрече с поврежденными участками образуются более стабильные комплексы XPC

с ДНК, после чего к поврежденному участку привлекаются другие факторы NER. Кроме того, XPC постоянно экспортируется из ядра и импортируется обратно. Такой обмен XPC в отсутствие повреждений поддерживает стационарный уровень его концентрации в ядре, предотвращая избыточное зондирование ДНК, способное препятствовать протеканию других процессов нуклеинового обмена. При любых воздействиях на клетку, приводящих к повреждению ДНК, скорость транспорта XPC в цитоплазму снижается, XPC накапливается в ядре, что способствует быстрому ответу системы репарации на генотоксическое воздействие. Наиболее выражен этот эффект при появлении повреждений, репарируемых NER. При этом обмен XPC между ядром и цитоплазмой затрудняется на 6–8 ч, что заметно превышает время нахождения XPC в составе комплексов NER. В качестве причины такой длительной остановки обмена обсуждается, в частности, медленная репарация некоторых типов УФ-повреждений [25]. Известно, что для эффективного узнавания УФ-повреждений XPC необходимо участие белка-партнера – гетеродимера UV-DDB [26–29].

Молекулярные основы взаимодействия XPC с ДНК интенсивно изучаются. От знания деталей механизма первичного узнавания ДНК-субстрата сенсорным белком зависит понимание взаимосвязи между структурой повреждения и скоростью его удаления из ДНК, а также того, каким образом фактор XPC находит поврежденные нуклеотиды на фоне огромного избытка неповрежденной ДНК. Значительному прогрессу в изучении устройства комплекса белка-сенсора с поврежденной ДНК способствовали рентгеноструктурные исследования комплекса Rad4 – дрожжевого ортолога XPC. Анализ структуры кристаллов комплекса укороченной формы Rad4 (а.о. 123–632) с белком Rad23 и гетеродуплексом, содержащим циклобутан-пиримидиновый димер, показал, что большой (трансглутаминазный, TGD) домен Rad4 вместе с одной β-шпилькой (VND1) образуют C-образную структуру, контактируя с 11 нуклеотидами неповрежденной дцДНК с 3'-стороны от повреждения. Другая часть Rad4 состоит из шпилечных доменов VND2 и VND3, формирующих, в основном, Ван-дер-Ваальсовы контакты с ДНК-субстратом вблизи повреждения. Длинная β-шпилька, выступающая из VND3, внедрена в двойную спираль, вызывая перегиб остова ДНК. Происходит вытеснение из спирали не только сшитых пиримидинов, но и расположенных напротив оснований неповрежденной цепи. При этом белок не контактирует с повреждением, взаимодействуя лишь с двумя соседними основаниями и двумя расположенными напротив CPD. Каждое из неповрежденных оснований оказывается зажатым

между остатками ароматических аминокислот из мотива VHD2/VHD3 [30]. Такой способ взаимодействия с оцДНК типичен для ОВ-субдомена – структурного элемента, представленного в белках с повышенным сродством к одноцепочечной ДНК [31]. Полученная для Rad4 картина хорошо соответствует представлениям о способе взаимодействия белка XPC с поврежденной ДНК, основанным на данных о его структуре, и результатах биохимических исследований. С применением метода атомной силовой микроскопии было показано, что связывание XPC приводит к возникновению перегиба остова ДНК-дуплекса в районе повреждения с образованием угла $\sim 140\text{--}130^\circ$ [32]. Возникающий перегиб оси спирали поврежденной ДНК, как показано с помощью перманганатного футпринтинга, сопровождается частичным плавлением дуплекса (примерно на 4–7 нуклеотидов) [33]. Сходство способов расположения факторов RAD4 и XPC на поврежденной ДНК подтверждается результатами экспериментов по фотопришивке этих белков к ДНК, содержащей объемную модификацию [34]. Очевидно, что именно такой способ взаимодействия XPC с ДНК, «стратегия не прямой проверки» наличия структурных нарушений, приводящих к повышенному уровню колебаний неповрежденной цепи, является основой невероятно широкой субстратной специфичности системы GG-NER. В структуре XPC человека обнаружен также транслугаминазный домен и домен, близкий по структуре ОВ-субдомену фактора RPA, взаимодействующий с оцДНК с использованием «ароматического сенсора повреждений» – пары аминокислотных остатков Trp690 и Phe733 [35–37].

Эксперименты с применением FRAP, в которых были использованы укороченные с N- и C-концов формы XPC, позволили выявить основной фрагмент XPC, отвечающий за узнавание поврежденной ДНК. Оказалось, что фрагмент, составляющий фактически только 15% от полноразмерного XPC (минимальный сенсор), способен распознавать УФ-повреждения в живых клетках. Минимальный сенсорный фрагмент проявляет предпочтение к гетеродуплексам и одноцепочечным олигонуклеотидам, распознает повреждения, используя сродство к участкам, водородные связи которых нарушены. Фрагмент состоит из VHD1, VHD2 и короткого мотива (25 аминокислотных остатков), расположенного между доменами VHD2 и VHD3 и уложенного в структуру, названную β -витком (β -turn – поворот, виток). Эффективность работы минимального сенсора повреждений зависит от специфических свойств β -витка [38, 39]. Этот короткий фрагмент полипептида способен как притягиваться к ДНК, так и отталкиваться от нее, что дает XPC возможность динамически взаимодействовать с ДНК в контексте генома и облегчает узнавание по-

вреждения, обеспечивая достаточную мобильность молекул белка-сенсора, сканирующих ДНК. Укороченный с C-конца XPC, содержащий β -виток, сохраняет некоторую остаточную активность в репарации, что установлено с помощью метода реактивации клеток. Повышенную подвижность XPC в ядрах живых клеток подтверждают результаты оценки динамики перемещений белка с использованием фотоотбеливания [24]. С использованием того же подхода было показано, что только в ядрах клеток, содержащих мутантные формы XPC с сохраненным β -витком, наблюдалась быстрая иммобилизация XPC после УФ-облучения. Стоит особо отметить, что полипептидный фрагмент, включающий VHD1 и VHD2, также действует как минимальный сенсор только при наличии β -витка. Биохимические эксперименты показывают, что подвижность XPC в ядре, определяемая этим элементом структуры, обусловлена отталкиванием молекулы белка от неповрежденной дцДНК. И наконец, в контексте полноразмерного XPC динамическая роль β -витка подтверждена результатами сайт-направленного мутагенеза с заменой глутаминовой кислоты на лизин. Эта инверсия заряда была проведена в предположении, что она может уменьшать силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженной боковой цепью белка и фосфатами в остове ДНК. Как и предполагалось, инверсия заряда увеличивала сродство мутантных молекул XPC к неповрежденной ДНК, приводя к уменьшению их мобильности в ядре и снижая активность системы GG-NER. Таким образом, β -виток играет ключевую роль в регуляции динамики взаимодействия XPC с нормальным ДНК-дуплексом. Благодаря своей способности отталкиваться от ДНК, этот субдомен облегчает узнавание повреждения, придавая достаточную мобильность молекулам XPC, находящимся в поисках повреждений в геноме [24, 35–38]. Нуклеопротеиновые интермедиаты, образующиеся при начальном скрининге, могут превращаться в прочный узнающий комплекс при связывании XPC с аномально осциллирующим участком нативной цепи способом, при котором исключены прямые контакты XPC с повреждением [29, 36–39].

В клетке XPC существует в виде гетеротримерного комплекса XPC-HR23B-Cen2 [1, 2, 18]. Субъединица HR23B обеспечивает стабильность, защиту от протеасомной деградации и стимуляцию ДНК-связывающей активности XPC. Рекомбинантный гетеродимер XPC-HR23B представляет собой прочный комплекс, который взаимодействует с различными типами повреждений *in vitro* и широко используется для проведения реакции NER в реконструированной системе [18, 40, 41]. Взаимодействие XPC-HR23B с поврежденной ДНК было проанализировано с при-

менением метода аффинной модификации. В качестве зондов использовали ДНК-дуплексы различной структуры, содержащие объемные модификации, в том числе фотоактивные фторхлоразидопиридинильные повреждения. Ряд модельных дуплексов содержал аналоги неповрежденных цепей, созданные с использованием нуклеотидных звеньев с 4-тио- и 5-йод-модифицированными основаниями – фотореагентами с нулевой длиной линкера [34, 42–44]. Использованы также дуплексы, содержащие платиновый аддукт [45]. Мишенью модификации во всех случаях была только большая субъединица ХРС. Второй высокомолекулярный нуклеопротеиновый аддукт с меньшей электрофоретической подвижностью возникал в результате фотопришивки по различным аминокислотным остаткам ДНК-связывающей субъединицы ХРС [44]. Кроме того, продукт белок-белковых шивок ХРС и HR23В, который появляется после жесткого (254 нМ) и длительного (60 мин) УФ-облучения и выявляется с помощью вестерн-блоттинга, не только не несет радиоактивной метки, но и образуется независимо от присутствия ДНК-зонда [45]. Отсутствие продуктов фотопришивки HR23В к аналогам поврежденной ДНК указывало на то, что эта субъединица комплекса не участвует в непосредственных контактах с ДНК. Совсем недавно с использованием конфокальной микроскопии было показано, что в клетке HR23В, в отличие от ХРС, не иммобилизуется на поврежденной ДНК, после связывания ХРС он высвобождается из комплекса [46].

Функции центрина-2 в ХРС-комплексе до конца не выяснены. Известно, однако, что присутствие этого белка повышает стабильность, может контролировать сродство/селективность связывания ДНК димером ХРС-HR23В и вовлечение в процесс репарации фактора ТFIIN за счет взаимодействия с С-концевым фрагментом ХРС [35].

С нуклеопротеиновым комплексом, сформированным поврежденной ДНК и ХРС, связывается фактор ТFIIN, после чего начинается проверка статуса поврежденной ДНК как субстрата NER – наличия объемной химической модификации в обнаруженном ХРС участке ДНК с нарушенной регулярной структурой.

ПРОВЕРКА ПОВРЕЖДЕНИЯ И СБОРКА ГОТОВОГО К УДАЛЕНИЮ ПОВРЕЖДЕННОГО УЧАСТКА КОМПЛЕКСА

Фактор ТFIIN представляет собой многосубъединичный комплекс, в состав которого входят две хеликазы – ХРВ и ХРД, белки р62, р52, р44, р34 и р8, не обладающие ферментативной активностью, и комплекс CDK-активирующей киназы САК (циклин

Н, Cdk7, Mat1). В 3D-модели ТFIIN человека, созданной с использованием результатов электронно-микроскопического анализа, основной набор белков формирует несколько удлиненную кольцеобразную структуру (16 × 12.5 × 7.5 нм) с отверстием, диаметр которого (2.6–3.4 нм) достаточен для того, чтобы вместить двухцепочечную спираль ДНК [47]. Со структурой, формируемой коровыми белками, через ХРД соединен САК-субкомплекс, образуя выступ на внешней стороне кольца. Самая маленькая субъединица р8 (TTDA) также входит в состав кора. Зависимое от ХРС привлечение ТFIIN к повреждению контролируется прежде всего непосредственными контактами с ХРВ и р62-субъединицей (рис. 2). Кольцеобразная структура ТFIIN охватывает дцДНК с 5'-стороны от повреждения, при этом высвобождается киназный субкомплекс. Наиболее очевидным следствием присоединения ТFIIN является раскручивание двойной спирали ДНК вокруг повреждения, катализируемое двумя специализированными хеликазами ХРВ (3'→5') и ХРД (5'→3'). Формируется асимметричный участок разошедшихся цепей длиной примерно 27 нуклеотидов (22 нуклеотида с 5'-стороны от повреждения и 5 – с 3'-стороны). Этот этап проходит с использованием энергии макроэргической связи АТФ [48–51]. Механизм формирования одноцепочечных участков ДНК вокруг повреждения и проверки наличия модификации стал более понятным благодаря данным о структуре факторов ХРВ и ХРД, полученным при изучении кристаллической структуры белков-аналогов из архей [52–54], и результатам анализа структуры С-концевого фрагмента ХРВ человека [53]. Анализ структуры кристаллов ХРВ *Archaeoglobus fulgidus* показал, что этот белок содержит два геликазных домена – HD1 и HD2, в которых располагаются семь консервативных геликазных мотивов. Выявлены также два новых структурных мотива – RED в HD1, который состоит из трех заряженных аминокислотных остатков Arg, Glu и Asp, и мотив «большой палец» (thumb-like motif ThM) в HD2, аналогичный найденному в T7-ДНК-полимеразе. Аналоги человеческого ХРД из трех разновидностей архей (*Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus tokodaii*, *S. acidocaldarius*) содержат по четыре домена, включая HD1, HD2, Arch-домен и уникальный 4FeS-домен, содержащий Fe-4S-кластер, впервые обнаруженный в структуре геликазы [54–56]. Детали механизма взаимодействия ХРД с ДНК и структуру формируемых комплексов активно изучали на моделях рекомбинантных геликаз архей. Была создана модель взаимодействия ХРД с ДНК, в соответствии с которой оцДНК связывается в бороздке, находящейся между доменами Arch и HD2, и проходит сквозь отверстие (пору) в глобуле, диаметр которой

достаточно велик для свободного продвижения геликазы по ДНК. Можно было предполагать, что объемные аддукты, репарируемые системой NER, могут блокировать транслокацию XPD по расположенной таким образом оцДНК. Такое предположение согласуется, в частности, с ранее полученными данными

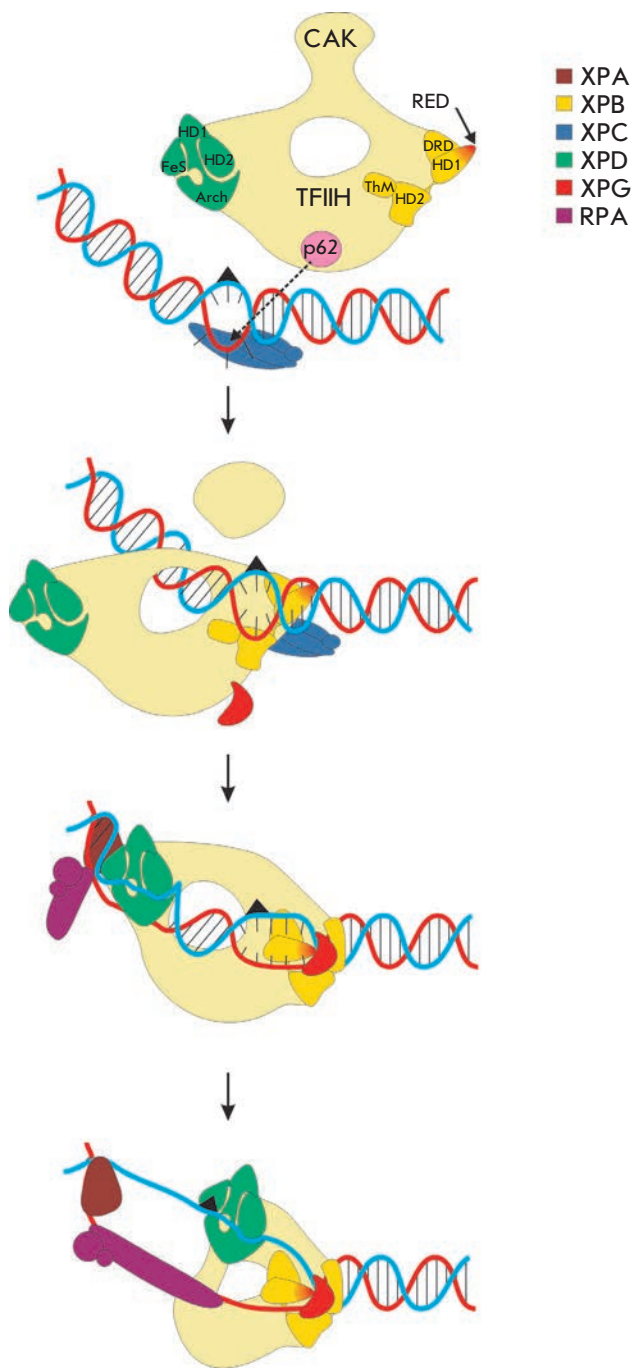


Рис. 2. Схема двустадийного процесса узнавания повреждения

об ингибировании активности дрожжевого аналога XPD – геликазы *rad3*, при взаимодействии с объемным повреждением [57]. С использованием аналога XPD из *Ferroplasma acidarmanus*, работающего в форме мономера, но близкого по структуре к белку человека, было показано, что хеликаза останавливается при встрече с повреждением в цепи, по которой транслоцируется в направлении 5'→3'. При этом, в отличие от хеликазной активности, которая ингибируется, у связавшегося с повреждением XPD сохраняется и даже возрастает АТФ-азная активность. Кроме того, фермент диссоциирует от субстрата, если CPD расположен в комплементарной 3'→5'-цепи [58]. На основе данных, полученных при анализе кристаллических структур архейных аналогов XPD, неоднократно высказывалось предположение, что наличие соответствующей модификации в ДНК окончательно проверяется при связывании основания в кармане, расположенном на поверхности XPD, вблизи «туннеля» в структуре белка, через который протягивается цепь ДНК [54, 56, 58]. Окончательно подтвердить, что XPD-субъединица TFIIH выполняет функцию проверки наличия повреждения, позволили результаты изучения взаимодействия мутантных белков XPD человека с ДНК, содержащей УФ-повреждения. Мутации вводили в участок полипептида, располагающийся в месте перехода ДНК-связывающего канала в пору (а.о. Y192A и R196E). При этом аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в хеликазную и АТФ-азную активность, не затрагивались. Мутантные белки сохраняли способность раскручивать дцДНК, но не различали поврежденные и неповрежденные ДНК. При замене этих остатков снижалась способность XPD формировать белковые комплексы – стабильные интермедиаты узнавания. Таким образом, показано, что эти аминокислотные остатки входят во фрагмент полипептида, формирующего сенсорный карман белка XPD человека. Расположение кармана совпадает с расположением в аналоге из архея *T. acidophilum* [59]. В отличие от XPD, фактор XPB, продвигающийся по ДНК в направлении 3'→5', проявляет свойства скорее АТФ-азы с минорной хеликазной активностью. В составе хеликазных доменов XPB впервые выявлены новые мотивы RED (в HD1) и Thumb (в HD2) [52–55]. Активность XPB стимулируется субъединицей p52 TFIIH [60]. Именно XPB первым связывается с изогнутой ДНК, находящейся в комплексе с XPC. Взаимодействуя с небольшим участком дестабилизированной неповрежденной цепи дцДНК (примерно 5 нуклеотидов с 3'-стороны), XPB разворачивает один из двух хеликазных доменов на 170°, увлекая за собой ДНК, сводя хеликазные домены 1 и 2, соединенные подвижным неструктурированным фрагментом, вы-

полняющим роль шарнира, и формируя сайт связывания АТФ. Затем при помощи короткого мотива RED, состоящего из заряженных аминокислот, ХРВ внедряется между цепями дцДНК, раскручивает ее примерно на 5 нуклеотидов в направлении 3'→5' и предварительно фиксирует ТФПН на ДНК. Кольцо ТФПН при этом наклоняется относительно оси спирали ДНК. При этом ХРД получает возможность контактировать с участком поврежденной цепи, удаленным в 5'-сторону от повреждения примерно на 22 нуклеотида, и раскручивает ДНК в направлении 5'→3', передвигаясь вдоль цепи за счет энергии гидролиза АТФ и формируя асимметричный «пузырь». При встрече с повреждением ХРД останавливается. Происходит характерная для объемных модификаций иммобилизация ХРД, а значит и ТФПН, на ДНК [50, 60, 61].

Если статус поврежденной ДНК как субстрата NER подтверждается появлением долгоживущей открытой нуклеопотеиновой структуры, включающей ТФПН, то начинается следующий этап репарации. Формируется более стабильный и протяженный комплекс, готовый к удалению поврежденного участка ДНК (англ. «preincision complex»). Происходит присоединение к комплексу факторов RPA и XPA, координированное взаимодействием между этими факторами и с субъединицами ТФПН.

RPA – трехсубъединичный белковый фактор, имеющий наибольшее сродство к одноцепочечным ДНК. RPA, участвующий во многих процессах метаболизма ДНК, представлен в клетке большим количеством копий [62]. Присутствие RPA необходимо для формирования «preincision»-комплекса и последующего удаления участка поврежденной ДНК [1]. Расположенные в субъединицах р70 и р32 RPA пять ДНК-связывающих доменов, обладающих различным сродством к субстрату, обеспечивают формирование с оцДНК комплексов с различной архитектурой и прочностью. Эти домены взаимодействуют с ДНК полярно (в направлении 5'→3') [63, 64]. В готовом к расщеплению комплексе RPA занимает примерно 30 нуклеотидов неповрежденной цепи напротив участка, содержащего повреждение, предохраняя ДНК от нелегитимной деградаци и способствуя точному позиционированию эндонуклеаз XPG и ERCC1-XPF.

XPA, как и XPC, обладает повышенным сродством к ДНК с особенностями вторичной структуры, в частности, к индуцированным объемным повреждением изломам спирали ДНК, что ранее послужило основанием для рассмотрения этого фактора (или его комплекса с RPA) в качестве претендента на роль сенсора повреждения, либо белка-контролера наличия модификации [1, 65, 66]. Однако, в отличие

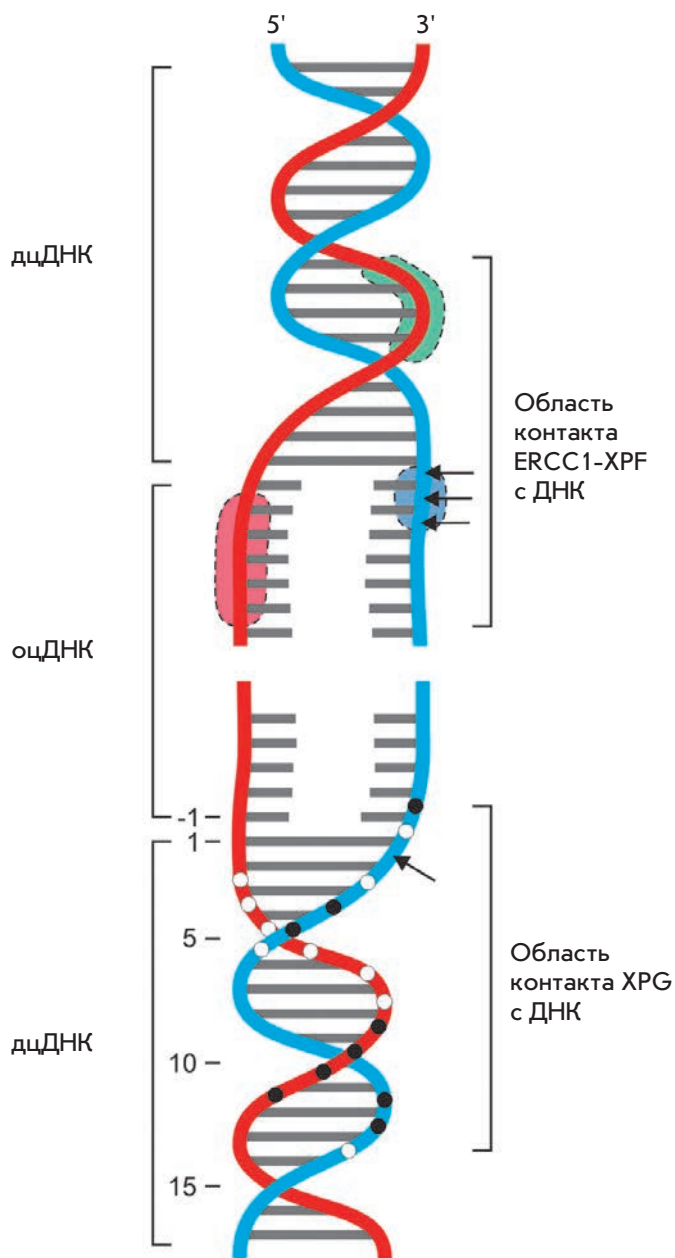
от XPC, фактор XPA взаимодействует предпочтительно с поврежденной цепью и обладает гораздо более низким сродством к ДНК-аналогам субстратов и интермедиатов NER [65, 66]. Небольшой и функционирующий в клетке в форме мономера XPA имеет достаточно сложную доменную структуру. Анализ ДНК-связывающего фрагмента XPA, в формирование которого вовлечены аминокислотные остатки с 98 по 219, проведенный с использованием ЯМР-спектроскопии, выявил на поверхности белка, ближе к С-концу ДНК-связывающего домена, положительно заряженную бороздку, состоящую примерно из 60 а.о. Геометрические параметры этой бороздки позволяют связывать как одноцепочечную, так и двухцепочечную ДНК [67, 68]. В структуре ДНК-связывающего домена XPA выделяют кислый субдомен (остатки 105–129), содержащий «цинковый палец», и С-концевой субдомен (а.о. 138–209). При этом мотив «цинковый палец» не участвует в связывании с ДНК, он необходим для взаимодействия с RPA [67]. С помощью сайт-направленного мутагенеза идентифицированы домены специфического взаимодействия XPA с целым рядом коровых полипептидов NER: RPA70, RPA32 (N-концевой и центральный фрагменты XPA), ERCC1 (короткий участок, прилегающий к N-концевому фрагменту XPA) и ТФПН (С-концевой фрагмент XPA). Взаимодействие XPA-RPA способствует более эффективному связыванию с ДНК обоих факторов [65, 66, 69], а взаимодействие с белками комплекса, уже сформированного на ДНК, раскрытой вокруг повреждения, обеспечивает высокий уровень селективности. Такие свойства XPA обусловлены особенностями его структуры, позволяющей легко менять конформацию и обеспечивающей эффективное взаимодействие с поврежденной ДНК в процессе формирования комплекса, готового к расщеплению. В настоящее время XPA рассматривается прежде всего как сенсор аномального электростатического потенциала, возникающего при перегибах отрицательно заряженного сахарофосфатного остова ДНК. Исследования взаимодействия серии мутантных форм XPA с модифицированными ДНК, проведенные с применением методов торможения в геле, фотопришивки к ДНК, содержащей арилазидную модификацию, позволили определить аминокислотные остатки, особенно важные для эффективного функционирования XPA [70]. С помощью аффинной модификации идентифицирована также область поврежденной цепи ДНК, с которой контактирует XPA. Использование серии ДНК-зондов с различным взаимным расположением имитирующего повреждение дезоксиуридина, содержащего объемную модификацию на основе флуоресцеина и фотоактивного 5-J-dU, позволило показать, что большая часть контактов XPA

с ДНК находится вблизи перехода оцДНК/дцДНК с 5'-стороны от повреждения [69]. Способность ХРА специфически взаимодействовать не только с ДНК, но и со многими белками NER (RPA, ERCC1-XPB, TFIIH, XPC) определяет его важную структурную и функциональную роль в сборке готового к проведению двойной инцизии комплекса [71–74].

УДАЛЕНИЕ ИЗ ДНК ФРАГМЕНТА, СОДЕРЖАЩЕГО ПОВРЕЖДЕНИЕ

Фактор XPG, выполняющий в процессе репарации функции 3'-эндонуклеазы, привлекается к району повреждения независимо от ХРА и RPA, через взаимодействие с TFIIH [74–76]. Связывание XPG с ДНК и одновременное высвобождение XPC завершают формирование на ДНК комплекса, готового к вырезанию поврежденного участка. XPG на этом этапе выполняет структурные функции, стабилизируя открытый комплекс, и не проявляет эндонуклеазной активности. Детерминантой характера взаимодействия XPG с ДНК-субстратами в процессе NER служит переход оцДНК/дцДНК с 3'-стороны от повреждения. С использованием различных методик футпринтинга и метода торможения в геле было показано, что XPG, как и другие члены семейства флэп-эндонуклеазы 1, взаимодействует с двухцепочечным участком модельных структур через неспецифические контакты с фосфодиэфирным остовом (рис. 3). Эти контакты охватывают примерно 12 нуклеотидов обеих цепей и расположены с внешней стороны В-спирали ДНК. Дополнительные немногочисленные контакты XPG в одноцепочечных участках модельных субстратов (в поврежденной цепи это три контакта с фосфодиэфирным остовом, характер контактов XPG с неповрежденной цепью пока не выяснен) слабо влияют на связывание. При этом необходимым условием для проявления XPG эндонуклеазной активности является наличие одноцепочечного участка поврежденной цепи вблизи места связывания белка [77, 78].

Фактор XPF – структурно-специфичная эндонуклеаза, которая расщепляет ДНК в месте перехода дцДНК/оцДНК с 5'-стороны от повреждения и функционирует в NER в составе гетеродимера с белком ERCC1. Облигатный гетеродимер ERCC1-XPF вовлекается в комплекс через взаимодействие ERCC1 с ХРА и производит разрыв в поврежденной цепи с 5'-стороны от повреждения. В ERCC1-XPF выявлено несколько доменов, обеспечивающих его функционирование [79–83]. Показано, что обе субъединицы содержат вблизи С-концов домены спираль-шпилька-спираль (HhH), необходимые для формирования гетеродимера [84]. Активный центр XPF представляет собой консервативный нуклеазный



- Область взаимодействия XPF с неповрежденной цепью
 - Область взаимодействия каталитического центра XPF с поврежденной цепью
 - Область взаимодействия ERCC1 с двухцепочечным участком ДНК
 - Участок сильного взаимодействия XPG с фосфатными группами ДНК
 - Участок слабого взаимодействия XPG с фосфатными группами ДНК
 - Поврежденная цепь ДНК
 - Неповрежденная цепь ДНК
- Стрелками показаны места возможного расщепления цепи ДНК

Рис. 3. Схематическое изображение контактов XPF-ERCC1 и XPG с ДНК в районе повреждения

домен, расположенный рядом с доменом HhH [79]. Центральный домен ERCC1 структурно гомологичен нуклеазному домену XPF, однако вместо активного центра с кислыми остатками он содержит бороздку, выстланную остатками основных и ароматических аминокислот. Этот структурный элемент взаимодействует с ХРА, осуществляя связь между ERCC1-XPF и остальной машиной NER [81, 83]. С использованием индивидуальных рекомбинантных доменов XPF, а также по данным изучения архейных XPF-белков установлено, что эти пять доменов участвуют во взаимодействии с ДНК [79–81]. Методами масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и *in vitro*-анализа связывания белка с ДНК определена структура комплекса С-концевого HhH-домена белка XPF с оцДНК в растворе [78]. Показано, что стабильный комплекс с оцДНК образует гомодимер HhH. При этом ДНК закручена вокруг белка так, что взаимодействия белок–ДНК располагаются вдоль фосфатного остова молекулы. Положительно заряженный участок во второй спирали одного из HhH-мотивов контактирует с фосфатным остовом оцДНК. Эти данные в сочетании с опубликованными ранее [85] позволили построить модель комплекса ERCC1-XPF, которая объясняет позиционирование эндонуклеазы на месте перехода дцДНК/оцДНК с 5'-стороны от повреждения. Согласно этой модели, HhH-домен ERCC1 взаимодействует с двухцепочечной частью ДНК-структуры. С поврежденной цепью ДНК контактирует нуклеазный домен XPF. Контакты с неповрежденной цепью осуществляют HhH-домены XPF и ERCC1 (рис. 3).

Роль С-концевых ДНК-связывающих доменов во взаимодействии гетеродимера с ДНК-субстратами была исследована с помощью мутационного анализа в контексте полноразмерного ERCC1-XPF. Оказалось, что мутации в одном домене не снижают заметно активность системы NER *in vitro* и *in vivo*. Нарушение работы системы NER происходит при введении мутаций в несколько доменов, причем существует иерархия важности отдельных доменов [84]. В присутствии каталитически неактивной XPG происходит катализируемое ERCC1-XPF расщепление поврежденной цепи ДНК с 5'-стороны (в 15–25 нуклеотидах от повреждения) с образованием свободной 3'-гидроксильной группы, необходимой для инициации репаративного синтеза и появления подвижного одноцепочечного фрагмента, содержащего повреждение. Происходящие изменения структуры белково-нуклеинового комплекса дают возможность XPG проявлять каталитическую активность [78]. Затем происходит расщепление ДНК с 3'-стороны (в 3–9 нуклеотидах от повреждения), завершающее процесс эксцизии поврежденного участка. В структуре

XPG, остающегося связанным с ДНК некоторое время после эксцизии, имеются мотивы, обеспечивающие специфическое взаимодействие с PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток). Предполагается, что XPG может способствовать эффективности и процессивности репаративного синтеза [1, 2].

РЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ

Репаративный синтез и лигирование цепи ДНК осуществляют ферменты и белковые факторы, которые также участвуют в процессе репликации ДНК. Для синтеза ДНК необходимы ДНК-полимеразы δ или ϵ и факторы RFC, PCNA и RPA. Комплекс RFC, состоящий из пяти разных субъединиц, способствует АТР-зависимому «нализыванию» PCNA на ДНК вблизи 3'-конца фрагмента ДНК, фланкирующего брешь, которая образуется в результате эксцизии. PCNA – гомотримерный комплекс, формирующий кольцеобразную структуру, которая скользит вдоль ДНК и взаимодействует с ДНК-полимеразами, способствуя повышению процессивности этих ферментов [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс NER управляется множественными слабыми взаимодействиями между белками и ДНК-субстратами, а также белок-белковыми взаимодействиями в нуклеопротеиновых комплексах. После того как в процессе первичного узнавания поврежденного участка в эукариотических клетках формируется прочный комплекс ХРС/ДНК, NER осуществляется фактически репаросомой – состоящим из большого числа субъединиц комплексом переменного состава и архитектуры. Каждая из субъединиц этого комплекса по отдельности не обладает достаточным сродством и селективностью по отношению к субстрату – ДНК, содержащей объемное повреждение. Ситуация меняется при формировании в районе повреждения специфических белковых комплексов. Белки NER в этих комплексах объединены находящейся в процессинге ДНК. До момента формирования стабильной структуры, готовой к удалению повреждения, и начала эксцизии в пределах двух-трех витков ДНК должны быть точно позиционированы 18 полипептидов. Структура участвующих в NER белков обеспечивает как возможность контактов с объединяющим их субстратом – ДНК, так и возможность динамических специфических белок-белковых взаимодействий, иногда взаимоисключающих. Смена контактов, которые может осуществлять один и тот же белок, – один из механизмов, регулирующих протекание процесса и производящих тонкую подстройку в репаративных комплексах, обеспечивая высокую точность протекания процесса эксцизионной репа-

рации нуклеотидов в ДНК. Изучение состава и архитектуры белково-нуклеиновых комплексов NER как *in vitro*, так и *in vivo*, требует применения широкого арсенала методов и модельных систем различной степени сложности. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00487а), РАН (программы фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Министерством образования и науки РФ (НШ-420.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gillet L.C., Schärer O.D. // *Chem. Rev.* 2006. V. 106. № 2. P. 253–276.
2. Sugawara K. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. № 1. P. 29–37.
3. Volker M., Mone M.J., Karmakar P., van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., van Driel R., van Zeeland A.A., Mullenders L.H. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 1. P. 213–224.
4. Lehmann A.R. // *Biochimie.* 2003. V. 85. P. 1101–1111.
5. Hanawalt P.C., Spivak G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 11. P. 958–970.
6. Friedberg E.C. // *Nat. Rev. Cancer.* 2001. V. 1. P. 22–33.
7. Hoeijmakers J.H. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6835. P. 366–374.
8. Kuraoka I., Bender C., Romieu A., Cadet J., Wood R.D., Lindahl T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 8. P. 3832–3837.
9. D'Errico M., Parlanti E., Teson M., de Jesus B.M., Degan P., Calcagnile A., Jaruga P., BJORAS M., Crescenzi M., Pedrini A.M., et al. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 18. P. 4305–4315.
10. Johnson K.A., Fink S.P., Marnett L.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 17. P. 11434–11438.
11. Luijsterburg M.S., Bornstaedt G., von Gourdin A.M., Politi A.Z., Moné M.J., Warmerdam D.O., Goedhart J., Vermeulen W., van Driel R., Höfer T. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. № 17. P. 445–463.
12. Sivilar D., Goellner E.M., Almeida K.H., Sobol R.W. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 12. P. 2491–2507.
13. Yang W. // *Cell Research.* 2008. V. 18. № 1. P. 184–197.
14. Isaacs R.J., Spielmann H.P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. № 5. P. 455–464.
15. Hess M.T., Schwitter U., Petretta M., Giese B., Naegeli H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 13. P. 6664–6669.
16. Buterin T., Meyer C., Giese B., Naegeli H. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. № 8. P. 913–922.
17. Sugawara K., Ng J., Masutani C., Iwai S., van der Spek P., Eker A., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H. // *Mol. Cell.* 1998. V. 2. № 2. P. 223–232.
18. Rademakers S., Volker M., Hoogstraten D., Nigg A.L., Moné M.J., van Zeeland A.A., Hoeijmakers J.H., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 16. P. 5755–5767.
19. Sugawara K., Shimizu Y., Shigenori I., Iwai S., Hanaoka F. // *DNA Repair.* 2002. V. 12. № 1. P. 95–107.
20. Nocentini S., Coin F., Saijo M., Tanaka K., Egly J.M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 37. P. 22991–22994.
21. Missura M., Buterin T., Hindges R., Hübscher U., Kaspárková J., Brabec V., Naegeli H. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 13. P. 3554–3564.
22. Hermanson-Miller I.L., Turchi J.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 7. P. 2402–2408.
23. Thoma B.S., Wakasugi M., Christensen J., Reddy M.C., Vasquez K.M. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 9. P. 2993–3001.
24. Sugawara K., Okamoto T., Shimizu Y., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 5. P. 507–521.
25. Hoogstraten D., Bergink S., Ng J., Verbiest V.H., Luijsterburg M.S., Geverts B., Raams A., Dinant C., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. № 16. P. 2850–2859.
26. Reardon J.T., Sancar A. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 20. P. 2539–2551.
27. Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., Ford J.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 47. P. 46906–46910.
28. Sugawara K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Hanaoka F. // *Cell.* 2005. V. 121. № 3. P. 387–400.
29. Scrima A., Koníčková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey P.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P., Thomä N.H. // *Cell.* 2008. V. 135. № 7. P. 1213–1223.
30. Min J.H., Pavletich N.P. // *Nature.* 2007. V. 449. № 7162. P. 570–575.
31. Murzin A.G. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 3. P. 861–867.
32. Janičević A., Sugawara K., Shimizu Y., Hanaoka F., Wijgers N., Djurica M., Hoeijmakers J.H., Wyman C. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. № 3. P. 325–336.
33. Mocquet V., Kropachev K., Kolbanovskiy M., Kolbanovskiy A., Tapias A., Cai Y., Broyde S., Geacintov N.E., Egly J.M. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 12. P. 2923–2932.
34. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Pestrjakov P.E., Petrusseva I.O., Sugawara K., Chen X., Min J.H., Lavrik O.I. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 15. P. 10936–10947.
35. Bunick C.G., Miller M.R., Fuller B.E., Fanning E., Chazin W.J. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 50. P. 14965–14979.
36. Maillard O., Solyom S., Naegeli H. // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 4. e79.
37. Camenisch U., Trutlein D., Clement F.C., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E., Naegeli H. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 16. P. 2387–2399.
38. Clement F.C., Camenisch U., Fei J., Kaczmarek N., Mathieu N., Naegeli H. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. № 1. P. 21–28.
39. Sugawara K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. № 4. P. 642–653.
40. Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugawara K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 22. P. 18665–18672.
41. Nishi R., Okuda Y., Watanabe E., Mori T., Iwai S., Masutani C., Sugawara K., Hanaoka F. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 13. P. 5664–5674.
42. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Gillet L.C., Petrusseva I.O., Schärer O.D., Lavrik O.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1770. № 5. P. 781–789.
43. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Petrusseva I.O., Vermeulen W., Schärer O.D., Lavrik O.I. // *Bioorg. Chem.* 2008. V. 36. № 2. P. 77–84.
44. Евдокимов А.Н., Петруссева И.О., Пестряков П.Е., Лаврик О.И. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 1. С. 188–200.
45. Neher T.M., Rechkunova N.I., Lavrik O.I., Turchi J.J. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 4. P. 669–678.
46. Bergink S., Toussaint W., Luijsterburg M.S., Dinant C., Alekseev S., Hoeijmakers J.H., Dantuma N.P., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. // *J. Cell Biol.* 2012. V. 196. № 6. P. 681–688.
47. Schultz P., Fribourg S., Poterszman A., Mallouh V., Moras D., Egly J.M. // *Cell.* 2000. V. 102. № 5. P. 599–606.
48. Araújo S.J., Nigg E.A., Wood R.D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 7. P. 2281–2291.

49. Oksenykh V., de Jesus B.B., Zhovmer A., Egly J.M., Coin F. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 19. P. 2971–2980.
50. Egly J.M., Coin F. // *DNA Repair.* 2011. V. 10. № 7. P. 714–721.
51. Compe E., Egly J.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. № 6. P. 343–354.
52. Fan L., Arvai A.S., Cooper P.K., Iwai S., Hanaoka F., Tainer J.A. // *Mol. Cell.* 2006. V. 22. № 1. P. 27–37.
53. Hilario E., Li Y., Nobumori Y., Liu X., Fan L. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 2. P. 237–246.
54. Wolski S.C., Kuper J., Hazelmann P., Truglio J.J., Croteau D.L., van Houten B., Kisker C. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 6. e149.
55. Fan L., Fuss J.O., Cheng Q.J., Arvai A.S., Hammel M., Roberts V.A., Cooper P.K., Tainer J.A. // *Cell.* 2008. V. 133. № 5. P. 789–800.
56. Kuper J., Wolski S.C., Michels G., Kisker C. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 2. P. 494–502.
57. Naegeli H., Modrich P., Friedberg E.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 14. P. 10386–10392.
58. Mathieu N., Kaczmarek N., Naegeli H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 41. P. 17545–17550.
59. Mathieu N., Kaczmarek N., Rütthemann P., Luch A., Naegeli H. // *Curr. Biol.* 2013. V. 23. № 3. P. 204–212.
60. Oksenykh V., Coin F. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 1. P. 90–96.
61. Fan L. How two helicases work together within the TFIIH complex, a perspective from structural studies of XPB and XPD helicases. Berlin-Heidelberg: Higher Education Press and Springer-Verlag, 2013. V. 1. 6 p.
62. Fanning E., Klimovic V., Nager A.R. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 15. P. 4126–4137.
63. De Laat W.L., Appeldoorn E., Sugasawa K., Weterings E., Jaspers N.G.J., Hoeijmakers J. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 16. P. 2598–2609.
64. Kolpashchikov D.M., Khodyreva S.N., Khlimankov D.Y., Wold M.S., Favre A., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 2. P. 373–379.
65. Hey T., Lipps G., Krauss G. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 9. P. 2901–2910.
66. Patrick S.M., Turchi J.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 18. P. 16096–17101.
67. Ikegami T., Kuraoka I., Saijo M., Kodo N., Kyogoku Y., Morikawa K., Tanaka K., Shirakawa M. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 8. P. 701–706.
68. Buchko G.W., Ni S., Thrall B.D., Kennedy M.A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. № 11. P. 2779–2788.
69. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 22. P. 8083–8094.
70. Camenisch U., Dip R., Vitanescu M., Naegeli H. // *DNA Repair (Amst.)* 2007. V. 6. № 12. P. 1819–1828.
71. Missura M., Buterin T., Hindges R., Hübscher U., Kaspárková J., Brabec V., Naegeli H. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 13. P. 3554–3564.
72. Thoma B.S., Vasquez K.M. // *Mol. Carcinog.* 2003. V. 38. № 1. P. 1–13.
73. Iakoucheva L.M., Walker R.K., van Houten B., Ackerman E.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 2. P. 131–143.
74. Park C.H., Sancar A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 11. P. 5017–5021.
75. Riedl T., Hanaoka F., Egly J.M. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 19. P. 5293–5303.
76. Zotter A., Luijsterburg M.S., Warmerdam D.O., Ibrahim S., Nigg A., van Cappellen W.A., Hoeijmakers J.H., van Driel R., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 23. № 23. P. 8868–8879.
77. Hohl M., Thorel F., Clarkson S.G., Schärer O.D. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19500–19508.
78. Hohl M., Dunand-Sauthier I., Staresincic L., Jaquier-Gubler P., Thorel F., Modesti M., Clarkson S.G., Schärer O.D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 9. P. 3053–3063.
79. Enzlin J.H., Schärer O.D. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 2045–2053.
80. Tsodikov O.V., Enzlin J.H., Schärer O.D., Ellenberger T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 32. P. 11236–11241.
81. Tsodikov O.V., Ivanov D., Orelli B., Staresincic L., Shoshani I., Oberman R., Schärer O.D., Wagner G., Ellenberger T. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 22. P. 4768–4776.
82. Tripsianes K., Folkers G., Ab E., Das D., Odijk H., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H., Kaptein R., Boelens R. // *Structure.* 2005. V. 13. № 12. P. 1849–1858.
83. Tripsianes K., Folkers G.E., Zheng C., Das D., Grinstead J.S., Kaptein R., Boelens R. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 17. P. 5789–5798.
84. Das D., Folkers G.E., van Dijk M., Jaspers N.G.J., Hoeijmakers J.H.J., Kaptein R., Boelens R. // *Structure.* 2012. V. 20. № 4. P. 667–675.
85. Su Y., Orelli B., Madireddy A., Niedernhofer L.J., Schärer O.D. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 26. P. 21846–21855.

УДК 577.11

«Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений

В. В. Макаров^{1,2}, А. Лав³, О. В. Синецына^{2,6}, С. С. Макарова^{2,5}, И. В. Яминский^{2,4},
М. Э. Тальянский^{2,3}, Н. О. Калинина^{1,2*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Центр перспективных технологий, 119311, Москва, ул. Строителей, 4, корп. 5

³Институт Джеймса Хаттона, Данди, Великобритания, DD2 5DA

⁴Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

⁵Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

⁶Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28

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

Поступила в редакцию 03.09.2013

РЕФЕРАТ Биобезопасность и экологическая чистота производства металлических наночастиц, применение которых во многих секторах экономики растет значительными темпами, являются актуальной проблемой. Химические и физические методы, применяемые для получения наночастиц, часто дороги и потенциально опасны для окружающей среды. Настоящий обзор посвящен возможностям синтеза металлических наночастиц с использованием экстрактов растений. Этот подход активно разрабатывается в последние годы в качестве альтернативного, эффективного, дешевого и экологически безопасного метода получения наночастиц с заданными свойствами. В обзоре детально рассмотрены различные факторы, влияющие на морфологию, размер и выход металлических наночастиц. Основное внимание уделено роли природных растительных соединений, участвующих в биовосстановлении солей металлов в процессе синтеза наночастиц. Приведены примеры эффективного использования экзогенных биоматриц (пептидов, белков и вирусных частиц) для получения наночастиц в экстрактах растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоматрицы, биовосстановление, металлические наночастицы, растительные метаболиты, экстракты растений.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое практическое применение наночастиц (частиц размером менее 100 нм) обусловлено целым рядом их уникальных свойств [1–4]. В настоящее время для синтеза металлических наночастиц используют различные физические и химические процессы, позволяющие получать наночастицы с заданными свойствами [5–8]. Однако, несмотря на широкое распространение, это, как правило, дорогостоящие, трудоемкие способы, сопряженные с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды и живых организмов [9, 10]. Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных экономически эффективных и в то же время безопасных и экологически чистых методах произ-

водства наночастиц [11–13]. В течение последнего десятилетия показано, что многие биологические системы, включая растения и водоросли [14], диатомовые водоросли [15, 16], бактерии [17], дрожжи [18], грибы [19] и клетки человека [20], могут превращать ионы неорганических металлов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления, осуществляемого белками и метаболитами, которые содержатся в этих организмах. Существенно, что производство наночастиц с использованием растений, описанию которого посвящен настоящий обзор, имеет важные преимущества перед другими биологическими системами. Низкая стоимость выращивания, короткие сроки производства, безопасность и возможность регуляции необходимого объ-

ема продукции делают растения привлекательной платформой для синтеза наночастиц [21].

РАСТЕНИЯ КАК БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ

Давно известно, что растения способны восстанавливать ионы металлов как на своей поверхности, так и в различных органах и тканях, удаленных от места проникновения ионов. В связи с этим растения используются для извлечения ценных металлов из земель приисков или карьеров в тех случаях, когда традиционные способы становятся невыгодными. Подобный процесс в настоящее время называется фитодобычей. Накопленные металлы можно извлекать из убранных растений с использованием агломерационного и плавильного методов. Интересно, что исследование процесса биоаккумуляции металлов в растениях показало, что металлы, как правило, откладываются в виде наночастиц. Например, растения *Brassica juncea* (листовая горчица) и *Medicago sativa* (люцерна посевная) накапливали наночастицы серебра размером 50 нм в количестве до 13.6% от собственного веса при выращивании на нитрате серебра в качестве субстрата [22]. Икосаэдры золота размером 4 нм выявлялись в *M. sativa* [23], полусферические частицы меди размером 2 нм – в *Iris pseudocorus* (ирис псевдоаирный) [24], выращенных на субстратах, содержащих соли соответствующих металлов. Очевидно, что целые растения могут быть использованы для производства наночастиц металлов. Вместе с тем существуют определенные ограничения, которые должны учитываться при промышленном применении данной технологии. Во-первых, размер и форма наночастиц варьируют в зависимости от места их локализации в растении, что, вероятно, зависит от различий в содержании ионов металлов в различных тканях и возможности проникновения наночастиц. В свою очередь, эти обстоятельства могут влиять на скорость постепенного отложения металла вокруг уже существующих наночастиц, а также на новые акты нуклеации (инициации формирования наночастицы) [23]. Неоднородность размера и морфологии наночастиц, образующихся в целых растениях, могут затруднять их использование в тех случаях, когда для определенной цели требуются частицы заданного размера и формы. Во-вторых, существует проблема эффективного извлечения наночастиц из растительного материала. Наконец еще одна проблема – невозможность адаптации формы наночастиц, синтезированных в целом растении, до соответствующей рыночным требованиям.

В связи с этим в последние годы активно развиваются подходы *in vitro*, в которых для биовосстановления ионов металлов с образованием наночастиц

используют растительные экстракты. Такие подходы обеспечивают более гибкий контроль за размером и формой наночастиц (например, путем изменения pH среды и температуры проведения реакции), а также способствуют простой последующей очистке. Существенно, что этот процесс происходит намного быстрее, чем синтез наночастиц в целых растениях, так как реакция происходит практически мгновенно без задержки, требующейся для поглощения и распространения ионов металла по всему растению. Целесообразность такого подхода показана с использованием экстрактов из множества различных видов растений в сочетании с разнообразием кислот и солей металлов, таких, как медь, золото, серебро, платина, железо и многие другие [22, 25–27].

Например, экстракты *Pelargonium graveolens* (герань пахучая) восстанавливали ионы золота до наночастиц десятигранной икосаэдрической формы размером 20–40 нм и стабилизировали их [28], в то время как в экстрактах из *Cymbopogon flexuosus* (лимонное сорго) синтезировались золотые наносферы и нанотреугольники размером 0.05–18 мкм [29]. Экстракт из *Azadirachta indica* (ним, азадирахта индийская) использовали для восстановления тетрахлорзолотой кислоты (HAuCl_4) в золотые плоские треугольники и шестиугольники размером 50–100 нм [30]. В этой работе также показано, что сок *A. indica* может восстанавливать нитрат серебра в полидисперсные сферические наночастицы размером 5–25 нм [30]. Экстракт листьев *Aloe barbadensis* (алоэ вера) использовали для производства кубических частиц In_2O_3 размером 5–50 нм [31]. С использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии показано, что такие растительные метаболиты, как сахара, терпеноиды, полифенолы, алкалоиды, фенольные кислоты и белки, играют важную роль в восстановлении ионов металла до наночастиц и в обеспечении их последующей стабильности [29, 30, 32–34]. Было высказано предположение, что контроль размера и морфологии наноструктур может быть связан с взаимодействием этих биомолекул с ионами металлов [30]. Различные растения различаются концентрацией и составом этих биологически активных компонентов. По всей видимости, этим можно частично объяснить морфологическое разнообразие описанных наночастиц: треугольники, шестиугольники, пятиугольники, кубы, сферы, эллипсоиды, нанопровода, наностержни. Разнообразие морфологии и размера наночастиц, синтезируемых из ионов различных металлов в экстрактах растений разных видов, детально описано в обзорах [11, 35]. В качестве примера на рис. 1 приведены изображения наночастиц серебра, золота и железа, образованных в экстрактах *Nicotiana benthamiana*.

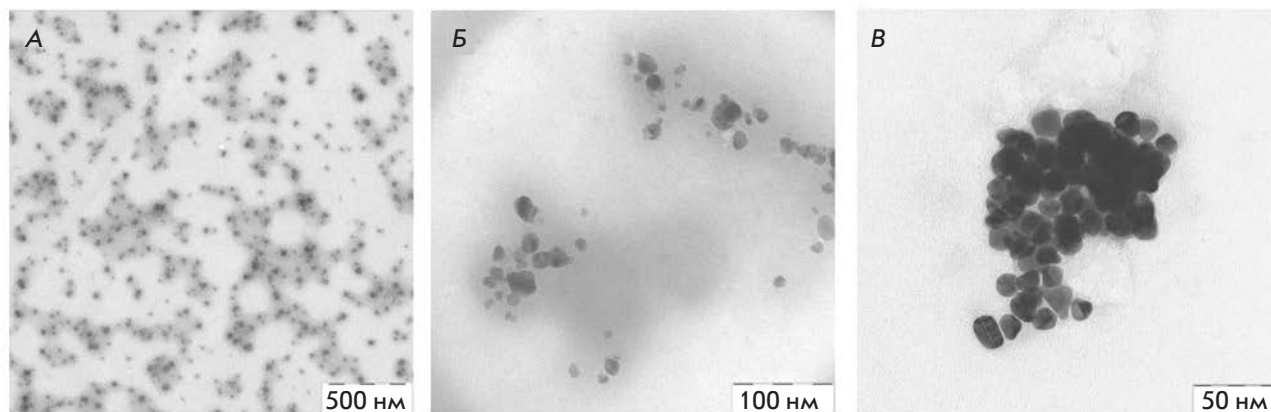


Рис. 1. Электронные микрофотографии наночастиц железа (А), серебра (Б) и золота (В), синтезированных в экстрактах *N. benthamiana* при комнатной температуре

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ В СВЯЗЫВАНИИ И ВОССТАНОВЛЕНИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Как упоминалось выше, разнообразные метаболиты растения, включающие терпеноиды, полифенолы, сахара, алкалоиды, фенольные кислоты и белки, играют важную роль в биовосстановлении ионов металла с образованием наночастиц. Примеры основных типов соединений, способных восстанавливать ионы металла, приведены на рис. 2.

С использованием ИК-Фурье-спектроскопии наночастиц, синтезированных в растениях/растительных экстрактах, показано, что терпеноиды часто ассоциированы с наночастицами. Терпеноиды представляют собой класс разнообразных органических полимеров, синтезирующихся в растениях из пятиуглеродных изопреновых звеньев. Терпеноиды обладают мощным антиоксидантным действием. Шанкар и соавт. [29] предполагают, что именно они играют ключевую роль в превращении ионов серебра в наночастицы в реакциях с использованием экстрактов из листьев герани. Обнаружено [36], что эвгенол, основной терпеноид экстрактов *Cinnamotum zeulanicum* (корица), был главным участником биовосстановления HAuCl_4 и AgNO_3 с образованием наночастиц. На основании данных ИК-Фурье-спектроскопии предположили [36], что диссоциация протона ОН-группы эвгенола приводит к образованию резонансных структур, способных к дальнейшему окислению. Этот процесс сопровождается активным восстановлением ионов металлов с последующим образованием наночастиц.

Показано, что в растениях флавоноиды могут включать ионы металлов в хелатный комплекс и восстанавливать их. Флавоноиды представляют собой обширную группу полифенольных соедине-

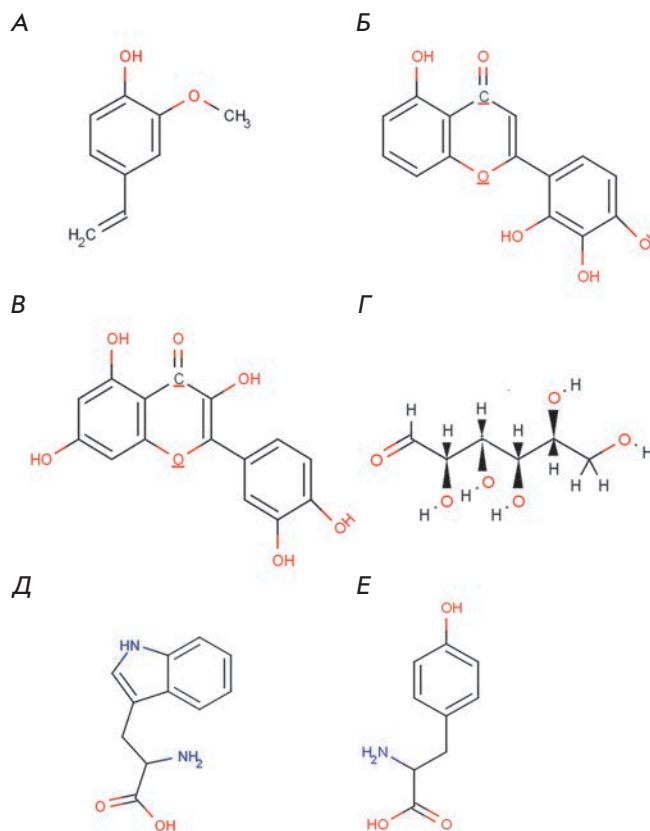


Рис. 2. Основные типы растительных метаболитов, участвующих в синтезе металлических наночастиц. А – терпеноиды (эвгенол); Б, В – флавоноиды (лютеолин (Б), кверцетин (В)); Г – восстанавливающая гексоза с открытой формой цепи; Д, Е – аминокислоты (триптофан (Д), тирозин (Е))

ний, в которых выделяют несколько классов: антоцианы, изофлавоноиды, флавонолы, халконы, флавоны и флаваноны. Флавоноиды содержат различные функциональные группы, которые могут вызывать образование наночастиц. Предположено, что таутомерные превращения флавоноидов из енольной формы в кетоформу могут высвобождать реакционноспособный атом водорода, который может восстанавливать ионы металлов с образованием наночастиц. Например, считается, что в случае экстрактов *Ocimum basilicum* (базилик душистый) именно преобразование флавоноидов лютеолина и розмариновой кислоты из енол- в кетоформу играет ключевую роль в формировании наночастиц серебра из ионов Ag [37]. Вполне вероятно, что внутренний механизм преобразования кетонов в карбоновые кислоты в флавоноидах может участвовать в восстановлении ионов Au³⁺. Интересно, что некоторые флавоноиды обладают способностью хелатировать ионы металлов через их карбонильные группы или π-электроны. Например, кверцетин является флавоноидом с очень сильной хелатирующей активностью, так как он может образовывать три хелатных цикла с участием карбонила и гидроксильных в положении С3 и С5 и катехольной группы в положении С3' и С4'. Эти группы хелатируют разнообразные ионы металлов, такие, как Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Pb²⁺ и Co²⁺. Действительно, наличие таких механизмов может объяснять способность флавоноидов адсорбироваться на поверхности формирующейся наночастицы. Это, вероятно, означает, что они принимают участие в стадиях инициации формирования наночастицы (нуклеации) и дальнейшей агрегации в дополнение к стадии биовосстановления. Кроме того, изолированные флавоноиды и гликозиды флавоноидов обладают способностью индуцировать образование металлических наночастиц. Например, апиин (гликозид апигенина) был выделен из *Lawsonia inermis* (лавсония неколючая, хна) и использован для синтеза анизотропных золотых и квазисферических серебряных наночастиц со средним размером 21–30 нм [38]. ИК-Фурье-анализ показал, что апиин прикреплен к наночастицам через карбонильную группу.

Существуют данные, согласно которым сахара, присутствующие в растительных экстрактах, также могут индуцировать образование металлических наночастиц. Известно, что такие моносахариды, как глюкоза (линейные и содержащие альдегидную группу), могут действовать как восстановители. Те моносахариды, которые содержат кетогруппу, например фруктоза, могут действовать в качестве антиоксидантов только после того, как претерпят серию таутомерных преобразований из кетона в альдегид. Более того, восстанавливающая способность

дисахаридов и полисахаридов зависит от того, может или нет любой из их отдельных моносахаридных компонентов дециклизоваться в составе олигомера и, следовательно, обеспечить доступ (иона металла) к альдегидной группе. Например, дисахариды лактоза и мальтоза обладают восстанавливающей способностью, так как по крайней мере один из их мономеров может принимать открытую цепную форму. Напротив, у сахарозы нет способности восстанавливать ионы металлов, поскольку мономеры глюкозы и фруктозы связаны таким образом, что открытая цепная форма не может образоваться. Обнаружено [39], что глюкоза способна участвовать в синтезе металлических наночастиц разнообразной морфологии, тогда как фруктоза опосредует синтез монодисперсных наночастиц золота и серебра. Отмечено также [39], что глюкоза является более мощным восстановителем, чем фруктоза, так как антиоксидантный потенциал фруктозы ограничен кинетикой таутомерных сдвигов. Показано [39], что сахароза не способна восстанавливать нитрат серебра или хлорид палладия в наночастицы. Однако, когда эти соли металлов были заменены тетрахлорзолотой и тетрахлорплатиновой кислотой, то наночастицы формировались и в присутствии сахарозы. Вероятно, кислоты вызывали гидролиз сахарозы до свободной глюкозы и фруктозы, которые имеют структуру открытой цепной формы. В настоящее время считается, что альдегидная группа сахара окисляется до карбоксильной группы через нуклеофильное присоединение OH⁻, что, в свою очередь, приводит к восстановлению ионов металла и синтезу наночастиц. Сходный механизм предложен и для биовосстановления ионов золота с использованием экстракта лимонника [29].

ИК-Фурье-анализ наночастиц, синтезированных в растениях или растительных экстрактах, показал, что образующиеся наночастицы очень часто выявляются в ассоциации с белками [40]. Установлено, что аминокислоты обладают разной способностью связывания ионов металлов и их восстановления. Например, как ранее наблюдал Грюен [41], такие аминокислоты, как лизин, цистеин, аргинин и метионин, способны связывать ионы серебра. Другие исследования показали, что аспарат может восстанавливать тетрахлорзолотую кислоту с образованием наночастиц, хотя валин и лизин такой способностью не обладают [42]. Недавно Тан и соавт. [43] проанализировали все 20 природных α-аминокислот для того, чтобы определить их потенциал в восстановлении или связывании ионов металлов. Они обнаружили, что триптофан является самым мощным восстановителем ионов Au, тогда как гистидин – один из самых сильных связывающих ионы Au. Аминокислоты могут связывать ионы металла через amino- и карбониль-

ные группы основной цепи или через боковые цепи, такие, как карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислоты, или атом азота имидазольного кольца гистидина. Другие боковые цепи, связывающие ионы металлов, включают тиол (цистеин), простой тиоэфир (метионин), гидроксил (серин, треонин и тирозин) и карбонильные группы (аспарагин и глутамин) [44]. Изучение способности восстанавливать ионы металлов показало, что гидроксильные группы тирозина и карбонильные группы аспарагина и глутамина вовлечены в процесс восстановления ионов Ag. Боковые тиольные группы (например, цистеина) и аминокислотные группы также ответственны за восстановление ионов металлов.

После включения аминокислот в пептидную цепь их индивидуальная способность связывать и восстанавливать ионы металла может измениться. Например, формирование пептидного остова меняет функциональность R-углерода карбоновых кислот и аминов отдельных аминокислотных остатков, поскольку они переходят в форму, недоступную для взаимодействия с ионами металлов. Однако свободные боковые цепи аминокислот по-прежнему могут участвовать в связывании и восстановлении ионов металла. Пригодность боковых цепей для такого взаимодействия может меняться в зависимости от аминокислотной последовательности, влияющей на доступность отдельных групп. В работе Тан и соавт. [43] подробно объяснено, каким образом аминокислотная последовательность может влиять на способность белков хелатировать и/или восстанавливать ионы металлов. Обнаружено, что синтезированные пептиды, в состав которых входят аминокислоты, способные эффективно связывать ионы металла, и аминокислоты с высокой восстановительной активностью, имели более низкие показатели восстановления, чем ожидалось. Предположили, что сильное связывание ионов металла сказывается на способности аминокислот их восстанавливать. Установлено также, что пептиды, содержащие аминокислоты, слабо связывающие ионы металла, такие, как лейцин, фенилаланин и пролин, были неэффективными при восстановлении анионов тетрахлорзолотой кислоты, возможно, из-за неспособности удержать и нужным образом ориентировать ионы металла в процессе восстановления. Предполагается [44], что молекулы белка, способствующие образованию наночастиц из ионов металла, должны обладать высокой восстановительной активностью и высоким потенциалом для привлечения ионов металлов в участки молекулы, отвечающие за восстановление, однако их хелатирующая активность не должна быть чрезмерной. Дополнительно в этой работе показано, что аминокислотная последовательность белка может сильно

влиять на размер, морфологию и количество образующихся наночастиц. Например, синтетический пептид GASLWWSEKL быстро восстанавливает ионы металлов с образованием большого числа мелких наночастиц размером менее 10 нм, тогда как замена N- и C-концевых аминокислотных остатков в пептиде (SEKLWWGASL) приводит к более медленной реакции восстановления, в результате которой образуются более крупные наносферы и нанотреугольники размером около 40 нм. Эти данные указывают на то, что пептиды и белки, присутствующие в растительных экстрактах, играют, вероятно, очень важную роль в определении формы наночастиц и влияют на итоговый выход наночастиц.

В целом механизм синтеза металлических наночастиц в растениях и растительных экстрактах включает три основные фазы: 1) фазу активации, в процессе которой происходит восстановление ионов металла и нуклеация восстановленных атомов металла; 2) фазу роста, в течение которой происходит спонтанное включение мелких соседних наночастиц в частицы большего размера (непосредственное формирование наночастиц за счет гетерогенной нуклеации и роста), что сопровождается увеличением термодинамической стабильности наночастиц; кроме того, происходит дальнейшая аккумуляция ионов металлов и превращение мелких наночастиц в более крупные в процессе оствальдовского созревания, или перекоагуляции, и 3) фазу терминации процесса, определяющую окончательную форму наночастиц [44, 45]. Процесс образования наночастиц схематически изображен на рис. 3. При увеличении длительности фазы роста наночастицы агрегируют между собой, образуя нанотрубки, нанопризмы, наносестиугольники, а также множество других наночастиц нерегулярной формы [44, 46]. В фазе терминации наночастицы приобретают наиболее энергетически выгодную конформацию, причем на этот процесс сильно влияет способность растительного экстракта стабилизировать металлические наночастицы. Например, нанотреугольники имеют очень высокую поверхностную энергию, которая делает их менее стабильными, и, если стабильность наночастиц не поддерживается в данных экстрактах, то нанотреугольники будут приобретать более стабильную морфологию, такую, как усеченные треугольники, чтобы минимизировать свободную энергию Гиббса.

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛА В РАСТЕНИЯХ

Таким образом, на процесс восстановления ионов металлов с образованием наночастиц влияет большое количество факторов: кроме природы растительного экстракта, содержащего активные биомолекулы

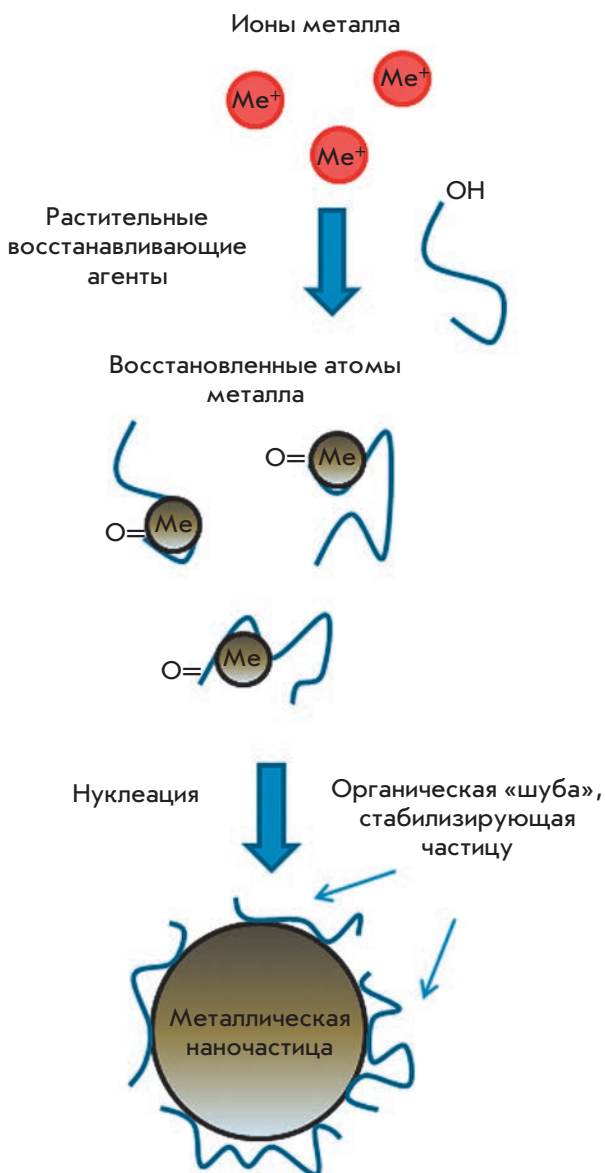


Рис. 3. Схема синтеза металлических наночастиц в растительном экстракте. Ионы металла связываются с восстанавливающими метаболитами и стабилизирующими агентами, восстанавливаясь до атомов металлов. Полученный комплекс атома металла с металлом взаимодействует с другими комплексами, формируя металлическую наночастицу, затем происходит рост и слияние отдельных мелких наночастиц в более крупные за счет процесса переконденсации до тех пор, пока частицы не примут форму и размер, стабильные в данных условиях

в разном сочетании и концентрации (эффекты которых описаны выше), сюда входят значение pH реакционной смеси, температура инкубации, продолжительность реакции, концентрация и электрохимический потенциал иона металла [11, 35, 47, 48].

Большое влияние на формирование наночастиц оказывает величина pH растительного экстракта [49–52]. Изменение pH приводит к изменению заряда природных фитореагентов в составе экстракта, что влияет на их способность связывать и восстанавливать катионы и анионы металлов в процессе синтеза наночастиц, а это в свою очередь может влиять на форму, размер и выход наночастиц. Например, в экстракте *Avena sativa* (овес посевной) более многочисленные золотые наночастицы небольшого размера формировались при pH 3.0 и 4.0, тогда как при pH 2.0 наблюдались более агрегированные частицы. Поэтому предположили, что при очень кислых значениях pH процесс агрегации наночастиц преобладает над процессом восстановления и первичной нуклеации восстановленных атомов. Возможно, это может быть связано с тем, что при pH 3.0 и 4.0 доступным становится большее число функциональных групп, связывающих и нуклеирующих ионы тетрагидрохлорзолотой кислоты, чем при pH 2.0. При pH 2.0 наиболее доступные ионы металла вовлекаются, по-видимому, в меньшее число событий нуклеации, что приводит к агломерации металла [52]. Напротив, с использованием экстрактов плодов груши показано, что гексагональные и треугольные нанопластины золота образуются при щелочных значениях pH, тогда как при кислых pH наночастицы не формируются [50]. Так, в случае ионов серебра (1+) и порошка клубней *Curcuma longa* (куркума длинная) существенно больше наночастиц серебра синтезируются при щелочных pH, при которых экстракты могут содержать больше отрицательно заряженных функциональных групп, способных эффективно связывать и восстанавливать ионы серебра [52].

Другой важный фактор, влияющий на формирование наночастиц в экстрактах растений, это температура [53–57]. В целом повышение температуры способствует увеличению скорости реакции и эффективности синтеза наночастиц. Так установлено, что в растениях люцерны (*M. sativa*) треугольные серебряные наночастицы образуются только при температуре выше 30°C [54]. Более того, эксперименты по синтезу наночастиц серебра в экстрактах *Lemon verbena* (вербена лимонная) показали, что повышение температуры реакции сопровождается ростом эффективности восстановления ионов серебра [56]. Причем при высоких температурах кристаллические частицы образуются значительно чаще, чем при комнатной температуре. Предполагается, что температура способствует увеличению частоты нуклеации. В опытах на экстрактах растения *Cassia fistula* (кассия трубчатая) обнаружили, что температура может влиять и на структурную форму синтезируемых наночастиц: при комнатной температуре форми-

руются в основном серебряные наноленты, тогда как при температуре выше 60°C основную массу составляют сферические наночастицы [55]. В этом случае считается, что более высокие температуры могут изменять взаимодействие фитореагентов с поверхностью наночастиц, ингибируя тем самым включение соседних наночастиц в структуру нанолент. Кроме того, более высокие температуры в некоторых ситуациях могут способствовать процессу нуклеации в ущерб процессу вторичного восстановления и дальнейшей конденсации металла на поверхности формирующихся наночастиц. Такое явление, как полагают, объясняет формирование сферических наночастиц золота при 80°C в спиртовых экстрактах *Nyctanthes arbor-tristis* (ночной жасмин), в отличие от наночастиц различной морфологии и «наноцветов», образующихся при комнатной температуре [57].

В связи с ограниченной возможностью растений восстанавливать ионы металлов эффективность синтеза металлических наночастиц также зависит от электрохимического потенциала иона [35]. Так, способность растительного экстракта эффективно восстанавливать ионы металла может быть существенно выше в случае ионов с большим положительным электрохимическим потенциалом (к примеру, Ag^+), чем в случае ионов с низким электрохимическим потенциалом, таких, как $[Ag(S_2O_3)_2]^{3-}$ [35].

Выше обсуждалось, что белки, входящие в состав растительного экстракта, могут значительно влиять на образование наночастиц. В последнее время для «зеленого» синтеза наночастиц металлов применяются подходы, сочетающие использование экстрактов растений с добавлением биоматриц – пептидов и белков, аминокислотная последовательность и структура которых оптимизированы для эффективной продукции наночастиц. Для поиска пептидов с соответствующими характеристиками используется метод фаговых дисплеев. Наилучшей способностью восстанавливать ионы металла обладают триптофан и такие аминокислоты, как тирозин, аргинин и лизин. Однако вследствие саморегуляции полипептид из одних остатков триптофана значительно менее эффективен, чем просто смесь молекул триптофана. В свою очередь пептиды, состоящие из различных аминокислот (к примеру, RWRWRWRWR), способных сильно связывать ионы, также плохо подходят в качестве биоматрицы для синтеза наночастиц вследствие возникающего энтропийного эффекта. Пептиды, в состав которых входят аминокислоты, слабо связывающие ионы тетрахлорзолотой кислоты, такие, как глутаминовая или аспарагиновая кислоты, тоже неэффективны при синтезе наночастиц по причине быстрой диссоциации комплекса пептид–ион металла. Таким образом, для формирования метал-

лических наночастиц наиболее подходят пептиды, в которых восстанавливающие и сильно связывающие аминокислотные остатки (к примеру, триптофан) чередуются со слабо связывающими аминокислотами, которые выполняют роль ап-регулятора. Следующий важный этап формирования металлических наночастиц – агрегация атомов восстановленного металла в наночастицы. Этот процесс зависит от многих факторов и определяет целый ряд свойств образующейся наночастицы, например ее размер или форму. В начале процесса на поверхности пептидной биоматрицы образуются небольшие частицы восстановленного металла, которые в дальнейшем при остальдовском созревании (переконденсации) перераспределяются в более крупные наночастицы. Показано, что чем быстрее и эффективнее идет формирование наночастиц, тем более изотропные и мелкие наночастицы получаются, поскольку эффективность переcondенсации зависит от времени. Например, изменяя аминокислотную последовательность и тем самым кинетику реакции формирования наночастиц, удавалось варьировать форму и размер получаемых наночастиц.

Выявленные закономерности верны и для высокомолекулярных биоматриц, таких, как вирусы и вирусоподобные частицы. В одном из первых исследований, выполненных с использованием этого подхода, РНК-содержащий вирус растений со спиральной симметрией (вирус табачной мозаики (ВТМ) длиной 300 нм и шириной 18 нм) или икосаэдрические частицы неинфекционного вируса папилломы крупного рогатого скота (частицы диаметром 55 нм, полученные самосборкой белка оболочки вируса, экспрессированного в растениях) добавляли к солям золота или серебра перед внесением экстрактов *N. benthamiana* или ячменя [58]. В присутствии вирусов/вирусоподобных частиц в низких концентрациях наблюдали уменьшение размера наночастиц при 4–5-кратном увеличении их количества по сравнению с образцами, не содержащими вирус (рис. 4Б,В) [58]. Интересно, что при высокой концентрации ВТМ количество образовавшихся наночастиц было значительно меньше, однако вирусные частицы были металлизированными (рис. 5). На внутренней и внешней поверхностях ВТМ и внешней поверхности частиц вируса папилломы крупного рогатого скота экспонированы боковые цепи аминокислот, способные хелатировать и восстанавливать ионы металлов. Например, на внешней поверхности ВТМ в составе экспонированных пептидных участков поверхностной петли и С-концевого района доступны карбоксильные и гидроксильные группы, в то время как во внутреннем канале ВТМ доступны аминокислотные группы [59]. На поверхности частиц вируса папилломы крупного рогатого

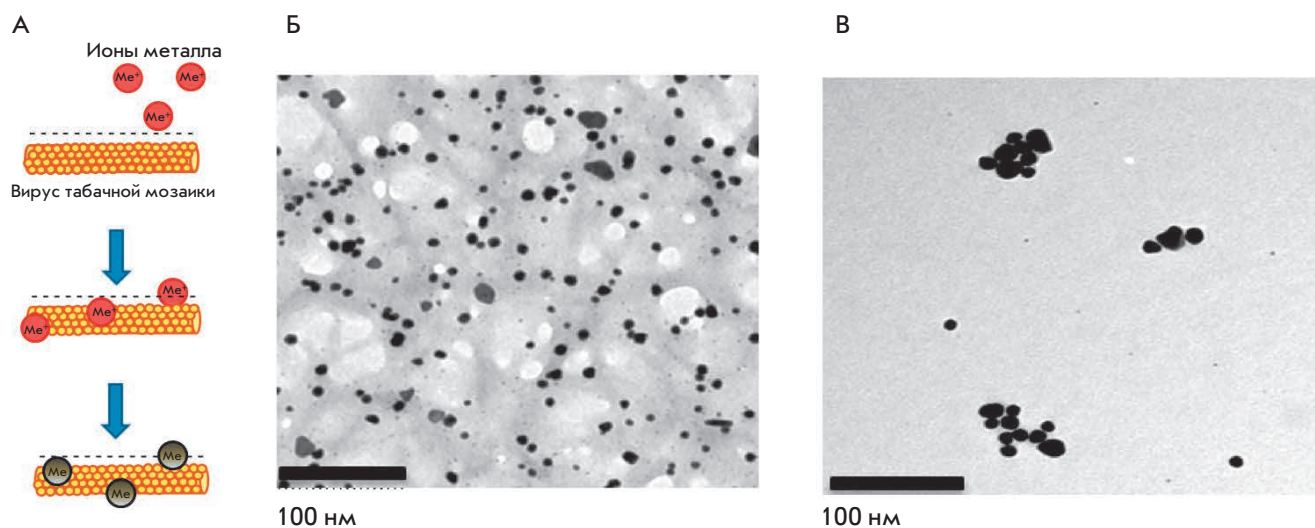


Рис. 4. Образование наночастиц в растительных экстрактах с использованием биоматриц. А – схема формирования наночастиц с участием вируса табачной мозаики как биоматрицы. Ионы металла, связываясь с отрицательно заряженными группами на поверхности вириона, восстанавливаются при добавлении растительного экстракта. При этом регулярное расположение данных активных групп значительно повышает число эффективных актов инициации формирования металлических наночастиц, что приводит к увеличению суммарного выхода в 3–5 раз. Б, Б' – электронные микрофотографии золотых наночастиц, образованных в растительном экстракте в присутствии (Б) и в отсутствие (Б') вируса табачной мозаики

скота доступны карбонильные, гидроксильные и карбоксильные группы [58]. Другой важный фактор, позволяющий рассматривать вирусы и вирусоподобные частицы как эффективные биоматрицы для синтеза наночастиц, – взаимная пространственная ориентированность активных пептидных групп, обусловленная регулярностью структуры этих биоматриц. Это может приводить к существенному ускорению реакции синтеза и, как следствие, к повышению выхода наночастиц. Поверхность вирусной частицы представляет собой плотные кассеты соответствующим образом упакованных белков оболочки (одна частица ВТМ состоит из 2130 молекул белка оболочки, а частица вируса папилломы крупного рогатого скота – из 360 молекул белка оболочки), представляющих собой высокорективную, квазирегулярную поверхность, которая может взаимодействовать с ионами металлов. Считается, что при низких концентрациях вируса в реакционной смеси ионы металла взаимодействуют с аминокислотными остатками в молекулах белка оболочки вируса, инициируя процесс нуклеации. При добавлении растительного экстракта преформированные центры нуклеации подвергаются значительно более быстрому процессу восстановления. Вполне возможно, что присутствие вируса в реакционной смеси ингибирует агрегацию путем увеличения числа центров нуклеации, что снижает вероятность включения большего числа ионов ме-

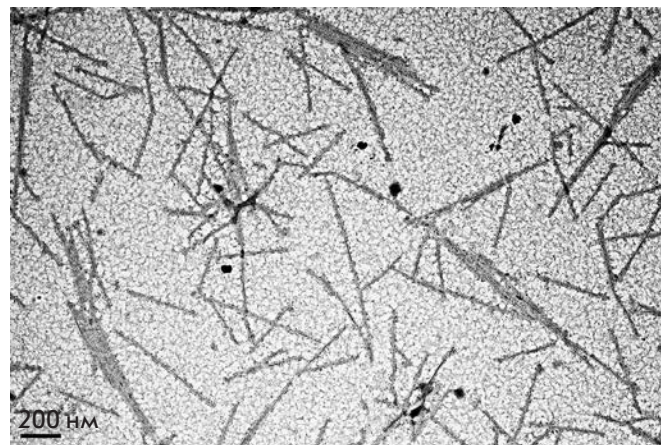


Рис. 5. Микрофотография металлизированного вируса табачной мозаики, полученная методом трансмиссионной электронной микроскопии

талла в меньшее число центров. При более высоких концентрациях вируса увеличение числа кластеризованных активных групп в составе аминокислотных остатков способствует, по-видимому, увеличению процессов связывания и восстановления ионов металла в непосредственной близости от поверхности вируса, что приводит к уменьшению формирования

свободных центров нуклеации и к подавлению образования металлических наночастиц вне вирусных кластеров («свободные» наночастицы). Последующее добавление растительных экстрактов быстро восстанавливает ионы металлов, хелатированные вирусными частицами, приводя к металлизации вирусных частиц (например, к образованию нанопроволок в случае ВТМ), но формирование «свободных» наночастиц уменьшается.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В РАСТЕНИЯХ

Разнообразие растительных экстрактов, типов солей металлов и способность варьировать состав реакционной смеси и условия проведения реакции путем изменения температуры, рН реакционной смеси и включения добавок биологического происхождения (биоматриц) позволяют создавать наночастицы различных металлов определенного размера и формы. Несмотря на то что «зеленый» синтез наночастиц с использованием растительного материала вызывает значительный интерес, необходимо изучить эквивалентность этих наночастиц и наночастиц, полученных с помощью физических и химических методов, а также аспекты применения и потенциальные масштабы производства наночастиц. Например, хорошо известно, что традиционные, полученные физико-химическими способами, наночастицы металла могут быть использованы и уже используются в терапии онкологических заболеваний, в качестве антисептических средств, в направленной доставке лекарств, молекулярной визуализации, очистке сточных вод, катализе, создании биосенсоров, топливных элементов, покрытий и косметических средств. Наночастицы, полученные в растениях/растительных экстрактах, протестированы до сих пор только в небольшом количестве практических приложений. Например, наночастицы серебра, полученные с использованием экстракта *Tridax procumbens* (тридакс), как и их эквиваленты, полученные химическими или физическими методами, обладают сильной антимикробной активностью в отношении *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* и *Vibrio cholera* [60]. Наночастицы серебра, полученные с использованием экстрактов шишек *Pinus thunbergii* (сосна Тунберга), проявляли антибактериальное действие в отношении различных грамположительных и грамотрицательных сельскохозяйственных патогенов, таких, как *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae*, *Burkholderia glumae* и *Bacillus thuringiensis* [61]. Наночастицы серебра, синтезированные в растениях, обладают значительной цитотоксической активностью в отношении различных линий опухолевых клеток. Обнаружено, что синтезированные в *Iresine herbstii* (ирезина Херб-

ста) наночастицы серебра ингибируют выживание и рост клеточных линий HeLa, а серебряные наночастицы, полученные с использованием экстрактов латекса *Euphorbia nivulia* (молочай), токсичны для линии клеток A549 рака легкого человека [62]. Наночастицы серебра, синтезированные в *Nerium oleander* (олеандр обыкновенный), обладали сильным ларвицидным действием против личинок переносчика малярии *Anopheles stephensi* [63].

В перспективе предполагается функционализация этих частиц антителами или пептидами для направленного действия в определенных тканях организма с целью достижения большей эффективности и уменьшения побочных эффектов. Недавно экстракты *Cyamopsis tetragonoloba* (гороховое дерево) были использованы для производства композитных наночастиц серебра, которые могут действовать в качестве биосенсора для определения аммиака, с возможностью применения в сельском хозяйстве и биомедицине. В зависимости от концентрации аммиака расстояние между наночастицами внутри нанокompозита изменяется, что влияет на его оптические свойства [64]. Показано, что наночастицы платины, полученные с использованием экстрактов *Ocimum sanctum* (базилик священный), обладают каталитической активностью и могут использоваться при производстве водородных топливных элементов [65]. Каталитическую активность приписывают также наночастицам золота, полученным в *Sesbania drummondii* (сесбания), которые могут участвовать в восстановлении ароматических нитросоединений, например, превращать крайне токсичный 4-нитрофенол в 2-амино-фенол, что предполагает их возможное участие в дезактивации отходов.

Приведенные примеры не исчерпывают всех данных о применении «зеленых» наночастиц, однако являются весомым свидетельством возможности практического использования наночастиц, синтезированных с участием растений/растительных экстрактов. Основной вопрос, на который будет необходимо ответить – отличаются ли биологические и физико-химические характеристики наночастиц растительного «происхождения» от характеристик их существующих прототипов, и насколько эти отличия влияют на эффективность применения наночастиц для конкретных практических задач. Существенно, что наночастицы, синтезированные в экстрактах растений, уже обладают функционализированной поверхностью, которая может содержать (в зависимости от условий реакции) органические лиганды, белки, полисахариды и многоатомные спирты, отсутствующие в наночастицах, синтезированных с помощью физических и химических методов. Присутствие этих биологических компонентов спо-

способствует, как известно, повышению стабильности частиц, а также может облегчить в случае необходимости последующее присоединение к наночастицам функциональных молекул, таких, как антитела или ДНК [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что синтез металлических наночастиц в экстрактах растений (растительных биомассах), несмотря на определенные ограничения, обладает значительным потенциалом и рядом существенных преимуществ перед традиционными методами синтеза наночастиц. Однако, чтобы экономически эффективно конкурировать с наночастицами, полученными физическими и химическими методами, следует масштабировать методы производства наночастиц с использованием растительного материала и разработать схемы для снижения издержек при их синтезе. Непрерывные методы синтеза наночастиц до сих пор применялись только при небольших масштабах про-

изводства. При использовании химического синтеза себестоимость наночастиц определяется в основном стоимостью солей металлов и восстановителей. В случае «зеленого» синтеза основные затраты будут определяться только стоимостью солей металлов, поскольку восстановителями могут служить растительные отходы пищевой промышленности. Более того, можно рассчитывать, что компании, занятые в пищевом секторе промышленности и заинтересованные в утилизации этих отходов, могут частично оплатить производство наночастиц. Это обстоятельство дополнительно подчеркивает экологические преимущества использования «зеленого» синтеза перед традиционными методами производства наночастиц. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», мероприятие 1.5, соглашение № 14.U02.21.1235.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roco M.C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 337–346.
- Zhang L., Gu F.X., Chan J.M., Wang A.Z., Langer R.S., Farokhzad O.C. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. V. 83. P. 761–780.
- Daniel M.C., Astruc D. // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 293–346.
- Wong T.S., Schwaneberg U. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 590–596.
- Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications / Ed. Fendler J.H. New York: John Wiley & Sons, 1998. 463 p.
- Tsuji M., Hashimoto M., Nishizawa Y., Tsuji T. // *Chem. Lett.* 2003. V. 32. P. 1114–1115.
- Kundu S., Maheshwari V., Saraf R. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. № 6. 065604.
- Okitsu K., Mizukoshi Y., Yamamoto T.A., Maeda Y., Nagata Y. // *Lett. Materials.* 2007. V. 61. P. 3429–3431.
- Narayanan K.B., Sakthivel N. // *Adv. Colloid. Interface. Sci.* 2010. V. 22. № 156. P. 1–13.
- Gan P.P., Ng S.H., Huang Y., Li S.F. // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 113. P. 132–135.
- Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. // *Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 46. P. 13940–13941.
- Sharma H.S., Ali S.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Sharma A. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009. V. 9. № 8. P. 5055–5072.
- Narayanan S., Sathy B.N., Mony U., Koyakutty M., Nair S.V., Menon D. // *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* 2012. V. 4. № 1. P. 251–260.
- Govindaraju K., Khaleel Basha S., Ganesh Kumar V., Singaravelu G. // *J. Materials Sci.* 2008. V. 43. P. 5115–5122.
- Scarano G., Morelli E. // *Biomaterials.* 2002. V. 15. № 2. P. 145–151.
- Scarano G., Morelli E. // *Plant Sci.* 2003. V. 165. P. 803–810.
- Lengke M.F., Fleet M.E., Southam G. // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 5. P. 2694–2699.
- Kowshik M., Deshmukh N., Vogel W., Urban J., Kulkarni S.K., Paknikar K.M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 78. № 5. P. 583–588.
- Rautaray D., Ahmad A., Sastry M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 48. P. 14656–14657.
- Anshup A., Venkataraman J.S., Subramaniam C., Kumar R.R., Priya S., Kumar T.R., Omkumar R.V., John A., Pradeep T. // *Langmuir.* 2005. V. 21. № 25. P. 11562–11567.
- Njagi E.C., Huang H., Stafford L., Genuino H., Galindo H.M., Collins J.B., Hoag G.E., Suib S.L. // *Langmuir.* 2011. V. 27. № 1. P. 264–271.
- Harris A.T., Bali R. // *J. Nanoparticle Res.* 2008. V. 10. P. 691–695.
- Gardea-Torresdey J.L., Parsons J., Gomez E., Peralta-Videa J., Troiani H., Santiago P., Yacaman M. // *Nano Lett.* 2002. V. 2. P. 397–401.
- Manceau A., Nagy K.L., Marcus M.A., Lanson M., Geoffroy N., Jacquet T., Kirpichtchikova T. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 5. P. 1766–1772.
- Ghosh S., Patil S., Ahire M., Kitture R., Gurav D.D., Jabgunde A.M., Kale S., Pardesi K., Shinde V., Bellare J. // *J. Nanobiotechnology.* 2012. V. 10. P. 17.
- Khan M., Adil S.F., Tahir M.N., Tremel W., Alkhatlan H.Z., Al-Warthan A., Siddiqui M.R. // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 1507–1516.
- Rai M., Yadav A. // *IET Nanobiotechnol.* 2013. V. 7. № 3. P. 117–124.
- Shiv Shankar S., Ahmad A., Sastry M. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. P. 1627–1631.
- Shiv Shankar S., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M.J. // *Mater. Chem.* 2003. V. 13. P. 1822–1846.
- Shiv Shankar S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2004. V. 275. P. 496–502.
- Maensiri S., Laokul P., Klinkaewnarong J., Prokha S., Promark V., Seraphin S. // *Optoelectronics Advanced Materials.* 2008. V. 2. P. 161–165.
- Vilchis-Nestor A.R., Sánchez-Mendieta V., Camacho-López M.A., Gómez-Espinosa R.M., Camacho-López M.A., Arenas-Alatorre J.A. // *Mater. Lett.* 2008. V. 62. P. 3103–3105.
- Song J.Y., Kwon E.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2010. V. 33. P. 159–164.

34. Song J.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2009. V. 32. № 1. P. 79–84.
35. Haverkamp R., Marshall A. // *J. Nanoparticle. Res.* 2009. V. 11. № 6. P. 1453–1464.
36. Singh A., Talat M., Singh D., Srivastava O.N. // *J. Nanoparticle Res.* 2010. V. 12. № 5. P. 1667–1675.
37. Ahmad N., Sharma S., Alam M.K., Singh V.N., Shamsi S.F., Mehta B.R., Fatma A. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 81. P. 81–86.
38. Kasthuri J., Veerapandian S., Rajendiran N. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2009. V. 68. P. 55–60.
39. Panigrahi S., Kundu S., Ghosh S., Nath S., Pal T. // *J. Nanoparticle Res.* 2004. V. 6. № 4. P. 411–414.
40. Zayed M.F., Eisa W.H., Shabaka A.A. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. V. 98. P. 423–428.
41. Gruen L.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 386. P. 270–274.
42. Saikat Mandal P., Selvakannan R., Phadtare S., Renu P., Sastry M. // *J. Chem. Sci.* 2002. V. 114. P. 513–520.
43. Tan Y.N., Lee J.Y., Wang D.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 16. P. 5677–5686.
44. Glusker J., Katz A., Bock C. // *Rigaku J.* 1999. V. 16. № 2. P. 8–16.
45. Si S., Mandal T.K. // *Chemistry.* 2007. V. 13. № 11. P. 3160–3168.
46. Kim J., Rheem Y., Yoo B., Chong Y., Bozhilov K.N., Kim D., Sadowsky M.J., Hur H.G., Myung N.V. // *Acta. Biomater.* 2010. V. 6. № 7. P. 2681–2689.
47. Selvakannan P., Mandal S., Phadtare S., Gole A., Pasricha R., Adyanthaya S.D., Sastry M. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2004. V. 269. № 1. P. 97–102.
48. Willett R.L., Baldwin K.W., West K.W., Pfeiffer L.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 22. P. 7817–7822.
49. Gan P.P., Li S.F. // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 169–206.
50. Ghodake G.S., Deshpande N.G., Lee Y.P., Jin E.S. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 75. P. 584–589.
51. Armendariz V., Herrera I., Peralta-Videa J.R., Jose-Yacamán M., Troiani H., Santiago P., Gardea-Torresdey J.L. // *J. Nanopart. Res.* 2004. V. 6. № 4. P. 377–382.
52. Sathishkumar M., Sneha K., Yun Y.S. // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 20. P. 7958–7965.
53. Bankar A., Joshi B., Ravi Kumar A., Zinjarde S. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 80. P. 45–50.
54. Lukman A.I., Gong B., Marjo C.E., Roessner U., Harris A.T. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2010. V. 353. P. 433–444.
55. Lin L., Wang W., Huang J., Li Q., Sun D., Yang X., Wang H., He N., Wang Y. // *Chem. Eng. J.* 2010. V. 162. P. 852–858.
56. Cruz D., Falé P.L., Mourato A., Vaz P.D., Luisa Serralheiro M., Lino A.R.L. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 81. P. 67–73.
57. Das R.K., Gogoi N., Bora U. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2011. V. 34. № 5. P. 615–619.
58. Love A.J., Makarov V.V., Yaminsky I.V., Kalinina N.O., Taliansky M.E. // *Virology.* 2014. V. 449. P. 133–139.
59. Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 208. P. 307–325.
60. Dhanalakshmi T., Rajendran S. // *Arch. Appl. Sci. Res.* 2012. V. 4. P. 1289–1293.
61. Velmurugan P., Lee S.M., Iydroose M., Lee K.J., Oh B.T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 7. P. 361–368.
62. Valodkar M., Rathore P.S., Jadeja R.N., Thounaojam M., Devkar R.V., Thakore S. // *J. Hazard. Mater.* 2012. V. 201. P. 244–249.
63. Suganya A., Murugan K., Kovendan K., Mahesh Kumar P., Hwang J.S. // *Parasitol. Res.* 2013. V. 112. P. 1385–1397.
64. Pandey G., Madhuri S., Mandloi A.K. // *Pl. Arch.* 2012b. V. 12. P. 1–4.
65. Soundarrajan C., Sankari A., Dhandapani P., Maruthamuthu S., Ravichandran S., Sozhan G., Palaniswamy N. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2012. V. 35. P. 827–833.
66. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. V. 109. P. 2422–2436.

УДК 577.21:576.364:615.085:576.367

Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния

И. А. Мучкаева^{1,2*}, Э. Б. Дашинимаев^{1,2}, А. С. Артюхов², Е. П. Мягкова^{1,2}, Е. А. Воротеяк^{1,2}, Е. Е. Егоров³, Х. С. Вишнякова³, Ю. Е. Кравченко^{3,4}, С. П. Чумаков^{3,4}, В. В. Терских¹, А. В. Васильев¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

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

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: izomerizaciya@list.ru

Поступила в редакцию 02.08.2013

РЕФЕРАТ Клетки дермальной папиллы (ДП) – уникальные региональные стволовые клетки кожи, оказывающие индукционное влияние на формирование и цикл регенерации волосяного фолликула. Ввиду того, что клетки ДП являются мультипотентными стволовыми клетками, мы предположили, что эффективность репрограммирования клеток ДП будет выше, чем эффективность репрограммирования дермальных фибробластов. При помощи трансфекции лентивирусными конструкциями, которые содержат гены репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, и добавлении вальпроевой кислоты в условиях физиологического уровня кислорода (5%) из клеток ДП человека мы получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Эффективность репрограммирования клеток ДП составила $\approx 0.03\%$, в то время как эффективность репрограммирования дермальных фибробластов при тех же условиях составила $\approx 0.01\%$. Таким образом, мы показали, что клетки ДП можно использовать как альтернативный источник индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клетки дермальной папиллы волосяного фолликула, репрограммирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; иДПК – иПСК, полученные из культуры клеток ДП; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; клетки ДП – клетки дермальной папиллы; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки (иПСК и ЭСК); ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЩФ – щелочная фосфатаза; DMEM/F12 – смесь модифицированной по способу Дульбекко среды Игла и субстрата Хэма F12; FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum); PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline).

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач в области изучения стволовых клеток – получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), которые представляют интерес для биологии развития и медицины. Современные клеточные технологии позволяют получать различные линии иПСК, которые можно использовать при моделировании многих заболеваний и испытании новых лекарственных средств. Развитие терапии, основанной на иПСК, связывают с получением продуктов для заместительной фер-

ментной терапии, а в дальнейшем и для нужд клеточной трансплантологии.

Клетки дермальной папиллы волосяного фолликула представляют собой региональные стволовые клетки кожи и являются уникальным объектом исследования. Они играют центральную роль в морфогенезе и цикле роста волосяного фолликула. В цикле роста волоса реорганизация волосяного фолликула происходит в результате серии индукционных взаимодействий между эпителиальными и мезенхимными клетками кожи. Еще в 1967 г. Oliver показал,

что клетки ДП способны индуцировать образование волосяных фолликулов [1]. Клетки ДП волосяного покрова головы происходят из нервного гребня, клетки ДП дорсальной стороны туловища – производные дерматома сомитов, а клетки ДП вентральной стороны туловища берут начало от висцерального листка спланхнотома. Известно, что в интактных клетках ДП работают сигнальные пути WNT, BMP и FGF [2]. Активация этих сигнальных путей способствует поддержанию индукционных свойств клеток ДП в культуре. Среди маркеров клеток дермальной папиллы выделяют щелочную фосфатазу (ЩФ), версикан, CD133 (у мыши), *Noggin*, *Lef1*. Вероятнее всего, наиболее точным маркером клеток ДП является ЩФ. Наибольшая экспрессия этого фермента достигается в раннем анагене. ЩФ рассматривают как индикатор индукционной способности ДП. Версикан представляет собой протеогликан внеклеточного матрикса, который синтезируется в анагене. При пассировании клеток ДП многие белки, в том числе и упомянутые ранее, очень часто не детектируются, и индукционный потенциал клеток ДП со временем исчезает.

К началу нашего исследования мы не имели сведений о публикациях, посвященных репрограммированию клеток ДП волосяного фолликула человека. Многие авторы считают, что для успешного репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния необходимо индуцировать в них экспрессию четырех транскрипционных факторов плюрипотентности – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* [3–5]. Higgins и соавт. [6] показали, что в клетках ДП человека при культивировании начинают синтезироваться *Klf4* и *c-Myc*, которые не детектируются в интактной ДП. Другой репрограммирующий фактор, *Sox2* [7], наоборот, синтезируется в интактной ДП, но не в культуре. Однако двумя годами ранее, в 2010 г., эти авторы отвергали факт синтеза *Sox2* в клетках ДП человека [6]. Принимая во внимание эти сведения, мы считали интересным использовать клетки ДП в качестве альтернативного источника iPСК, а также проверить эффективность процесса их репрограммирования. Мы предположили, что в нерепrogramмированных клетках ДП синтезируются как минимум два (*Klf4* и *c-Myc*), а возможно, и три фактора репрограммирования (*Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*), что будет способствовать приобретению клетками плюрипотентного статуса. Для увеличения эффективности репрограммирования мы культивировали клетки при добавлении вальпроевой кислоты [8] в условиях физиологического уровня кислорода 5% [9]. Таким образом, задача нашей работы состояла в получении iPСК из клеток ДП человека, оценке эффективности репрограммирования в подобранных условиях и в многосторонней характеристике полученных iDPK.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали следующие культуры клеток: клетки ДП волосяного фолликула человека; эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека линии hESMK05, любезно предоставленные М.А. Лагарьковой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН); первичную культуру эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ).

Клетки ДП человека выделяли по методике, которую применяют в нашей лаборатории [10]. Клетки культивировали в среде AmnioMAX II (Gibco) с добавлением 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Смену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Клетки по достижении субконфлюентного монослоя пассировали в соотношении 1 : 3. ЭСК человека линии hESMK05, а также полученные в результате репрограммирования iPСК человека растили в среде mTeSR™ 1 (STEMCELL Technologies) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂. iPСК пассировали либо механически с помощью пипетки с пластиковым наконечником, либо инкубацией в растворе 1 мг/мл диспазы (STEMCELL Technologies). В качестве субстрата для культивирования применяли комплекс белков внеклеточного матрикса и протеогликанов – матригель (BD Biosciences). Среду заменяли каждый день.

Получение клонов iDPK

Клетки ДП на третьем пассаже (0.5 млн в чашке Петри диаметром 30–60 мм) инфицировали в течение ночи лентивирусными векторами, несущими гены плюрипотентного состояния клеток (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*), в среде для культивирования клеток ДП при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂. Для улучшения эффективности инфицирования добавляли 5 мкг/мл полибрена (Sigma). Смену среды производили через день при добавлении химических соединений, увеличивающих эффективность репрограммирования: 2 мМ вальпроевой кислоты (Sigma) и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma). Через 7 сут среду для репрограммирования заменяли на среду для плюрипотентных стволовых клеток mTeSR™ 1 (STEMCELL Technologies). Среду заменяли каждый день. На первых пассажах клетки пересеивали механически на митотически неактивные МЭФ до начала контактирования колоний, а затем на пластик, покрытый матригелем (BD Biosciences). Первый пересев клеток производили на чашки Петри диаметром 100 мм и отменяли упомянутые выше добавки. Через 2–3 недели после пассирования клоны iPСК отбирали по поверхностному маркеру iPСК Tra-1-60 с помощью прижизненного иммуномечения и механического отбора положительных клонов.

Тест на активность щелочной фосфатазы

Для выявления щелочной фосфатазы использовали набор NBT/BCID (Roche) согласно протоколу производителя.

Иммуноцитохимия и проточная цитофлуориметрия

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида. Клетки инкубировали с первичными антителами (таблица) в течение ночи при 4°C в PBS с 1% BSA (Helicon) или 5% FBS (BioWest), со вторичными антителами Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 или Texas Red – в течение 60 мин при комнатной температуре. Ядра окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилидолом (DAPI) в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре (Vector Laboratories). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Olympus) и цифрового фотоаппарата Coolpix 8700 (Nikon). Количественную оценку клеток, экспрессирующих поверхностные антигены ПСК, проводили с помощью проточного цитофлуориметра Cell Lab Quanta™ SC

(Beckman Coulter). В каждой пробе анализировали не менее 30000 клеток в трех повторностях.

Тест на активность теломеразы

Активность теломеразы в клетках проверяли с помощью TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit (Millipore). В качестве фермента для ПЦР использовали полимеразу Encyclo («Евроген»).

Определение экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Суммарную РНК выделяли с помощью Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research) по предложенной фирмой инструкции с некоторыми модификациями. Обратную транскрипцию (ОТ) проводили с помощью набора для ОТ-ПЦР, используя олиго(dT)15-праймеры («Силекс»). ПЦР проводили с использованием ScreenMix-НХ («Евроген»). Праймеры подбирали из банка данных <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> и согласно статье Ohnuki и соавт. [11]. ПЦР проводили с помощью амплификатора фирмы Bio-Rad. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2% агароз-

Список антител, использованных в работе

Антитела (антигены)	Фирма-производитель	Продуцент антител	Рабочее разведение
Oct4	Millipore (MAB4401)	Мышь	1 : 200
Sox2	Cell Signalling (#3579)	Кролик	1 : 250
Nanog	Abcam (ab80892)	Кролик	1 : 400
SSEA3	STEMCELL Technologies (#01553)	Крыса	1 : 100
SSEA4	Abcam (ab16286)	Мышь	1 : 250
Tra-1-60	Abcam (ab16288)	Мышь	1 : 100
Tra-1-81	STEMCELL Technologies (#01556)	Мышь	1 : 300
Десмин	Abcam (ab15200)	Кролик	1 : 200
Нестин	Millipore (MAB5326)	Мышь	1 : 200
Даблкортин	Abcam (ab77450)	Кролик	1 : 200
β-III-тубулин	Millipore (MAB1637)	Мышь	1 : 100
Нейронспецифичная енолаза	DakoCytomation (M087329)	Мышь	1 : 200
Виментин	Abcam (ab8978)	Мышь	1 : 200
Пан-цитокератин	Santa-Cruz (sc-81714)	Мышь	1 : 20–1 : 50
Остеопонтин	Millipore (MAB3057)	Крыса	1 : 350
Остеонектин	Millipore (AB1858)	Кролик	1 : 500
Hnf4α	Santa-Cruz (sc-8987)	Кролик	1 : 50
Фоха2	Millipore (#07-633)	Мышь	1 : 100
Альфа-фетопротеин	R&D Systems (MAB1368)	Мышь	1 : 200
Альбумин	R&D Systems (MAB1455)	Мышь	1 : 250
СК8	Millipore (04-588)	Кролик	1 : 200
СК18	Millipore (MAB3234)	Мышь	1 : 100
Alexa Fluor 488	Molecular Probes (# A-11029, A-21206, A-21208)	Коза, осел	1 : 500
Alexa Fluor 594	Molecular Probes (# A-11032)	Коза	1 : 500

ном геле в Трис-ацетатном буфере и визуализировали с помощью УФ-анализатора гелей (BioRad).

Определение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили с использованием HS-SYBR («Евроген»). Анализировали кДНК, полученную в ходе обратной транскрипции. В одну реакцию брали кДНК (из 15 нг РНК), по 10 мкМ каждого праймера. Праймеры подбирали из следующих банков праймеров: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> и <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb>. Для построения стандартной кривой использовали растворы кДНК, разбавленные в 4, 16, 64 и 256 раз, с трехкратной повторностью. Амплификацию проводили согласно следующей программе: 95°C – 10 мин; далее 40 циклов, состоящих из двух этапов: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). На втором этапе каждого шага цикла фиксировали флуоресцентный сигнал, который использовали для построения амплификационной кривой. После 40 циклов строили кривую плавления продуктов реакции для проверки специфичности реакции и отсутствия побочных продуктов.

Получение, культивирование и анализ эмбрионных телец (ЭТ)

ЭТ получали культивированием в среде AggreWell™ (STEMCELL Technologies) либо в среде DMEM/F12 (Gibco), содержащей 20% заменитель сыворотки KSR (Gibco), 1× NEAA (Gibco), 1× GlutaMAX (Gibco), 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Каждое эмбрионное тельце формировалось в висячей капле, после чего выращивалось в Ultra Low Adhesion Plates (Corning) в суспензии без прикрепления клеток к пластику. Смену среды проводили каждый день. ЭТ фиксировали в 3% параформальдегиде, инкубировали в 15% растворе сахарозы, заключали в Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura) и замораживали в парах жидкого азота. Затем делали срезы толщиной 7.5 мкм на криотоме (CM1900), которые наслаивали на положительно заряженные предметные стекла. Блокировали неспецифическое связывание антител в PBS с 1% БСА. Далее препараты готовили как описано выше.

Направленная дифференцировка iPSC *in vitro*

Для дифференцировки использовали как кусочки эмбрионных телец, так и недифференцированные клетки (кластеры, занимающие 10–20% площади культуральной чашки). Подлинность дифференцировки подтверждали иммуноцитохимически.

Для индукции остеогенной дифференцировки клетки культивировали в среде DMEM/F12 с пониженным содержанием глюкозы («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (Gibco), 2 мМ глутамин («ПанЭко»), 0.1 мкМ дексаметазона (Sigma-Aldrich), 10 мМ β-глицерофосфата (Sigma-Aldrich), 50 мкМ аскорбат-2-фосфата, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Дифференцировку клеток в гепатоцитарном направлении проводили в индукционной среде, содержащей DMEM/F12 (Gibco), 10% FBS (Gibco), 2 мМ глутамин («ПанЭко»), 10 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF, Invitrogen), 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF, PeproTech), 20 нг/мл костного морфогенетического белка 2-го типа (BMP2, R&D), 0.03 мМ никотинамида. В первые 2–3 сут для индукции энтодермальной программы при дифференцировке из клеток, которые росли на подложке и образовывали ЭСК-подобные колонии, в среду был добавлен активин А (R & D) в концентрации 100 нг/мл (при дифференцировке из ЭТ добавления активина А не требуется). После отмены активина А в среду добавляли 30 нг/мл фактора роста фибробластов 4-го типа (FGF4, Invitrogen). По достижении клетками 80% конфлюентности из среды удаляли FGF4 и BMP2 и в течение 5–7 сут культивировали с онкостатином М (10 нг/мл, R&D) и дексаметазоном (0.1 мкМ, Sigma-Aldrich). После пассирования в среду вносили 1× B27 (Gibco) еще на 7–10 сут. Для индукции нейральной дифференцировки в среду DMEM/F12 (Gibco), содержащую 3% FBS (Gibco), 1× NEAA (Gibco), 1× GlutaMAX (Gibco), 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), в течение 7 сут добавляли по 20 нг/мл Noggin (Invitrogen) и фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF2, PeproTech). Затем клетки культивировали в присутствии 1× B27 (Gibco), через 7 дней добавляли по 10 нг/мл нейротрофического фактора роста (BDNF, PeproTech) и фактора роста нервов β (NGFβ, PeproTech) и культивировали в течение еще 7–14 сут.

Кариотипирование

Для приготовления препаратов хромосом в среду для культивирования клеток добавляли колцемид (Colcemid, Gibco). После инкубации с колцемидом клетки выдерживали в гипотоническом растворе (60 мМ KCl) и фиксировали в охлажденном до –20°C фиксаторе (метанол–ледяная уксусная кислота, 3 : 1). Полученную суспензию раскапывали на предметные стекла с высоты примерно 10 см с последующим поджиганием фиксатора на стекле. Для дифференциального окрашивания хромосомные препараты обрабатывали флуоресцентными красителями DAPI и 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

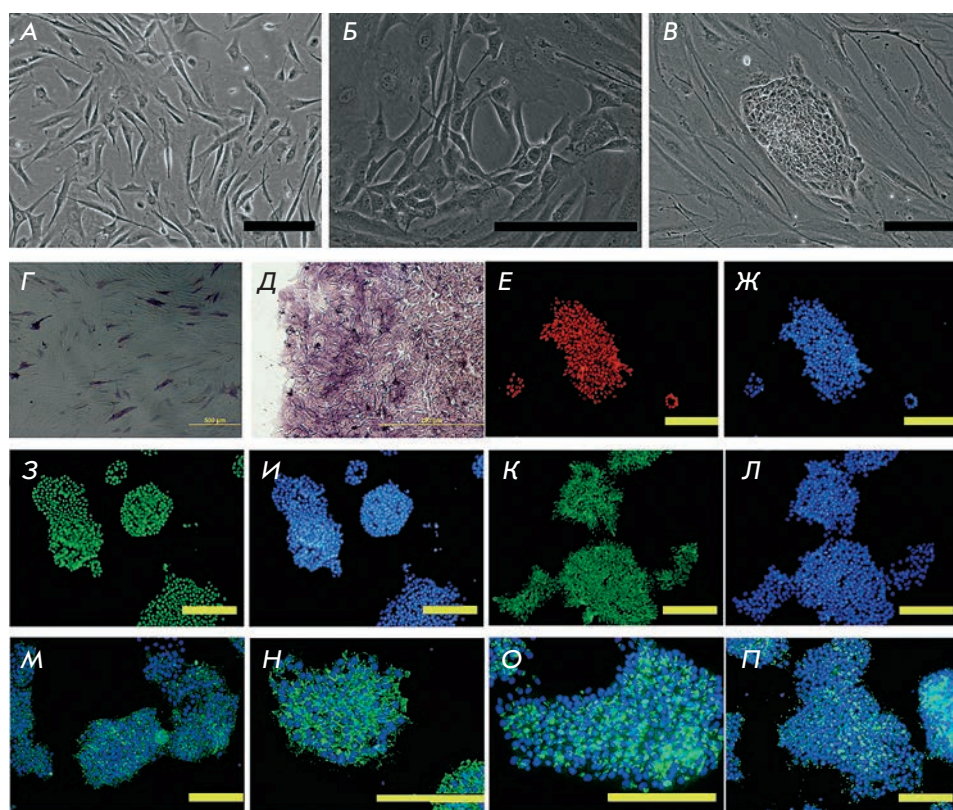


Рис. 1. Получение иДПК. А – исходная культура ДП человека; Б – репрограммированные клетки ДП на 8-е сут после инфицирования; В – репрограммированные клетки ДП на 11-е сут после инфицирования. Экспрессия щелочной фосфатазы нерепrogramмированными клетками ДП (пассаж 6) (Г) и полученными иДПК (пассаж 6) (Д). Иммунофлуоресцентное окрашивание иДПК против ядерных белков: Oct4 (Е), Sox2 (З), Nanog (К), и против поверхностных антигенов: SSEA3 (М), SSEA4 (Н), Tra-1-60 (О), Tra-1-81 (П). Ж, И, Л, М–П – ядра клеток докрашены DAPI (синий цвет). Масштабный отрезок 200 мкм (Ж, И, Л – то же поле зрения, что и Е, З и К соответственно)

Тест на тератообразование

Плюрипотентный статус индуцированных клеток проверяли с помощью стандартного *in vivo* теста на образование тератом. Около 5 млн недифференцированных клеток инъецировали подкожно мышам линии Nude с иммунодефицитом. После образования опухоли мышью умерщвляли, опухоль вырезали, фиксировали и готовили гистологические и иммуногистохимические препараты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По многим морфологическим и метаболическим критериям иПСК подобны ЭСК. В данной работе мы сравнивали полученные иПСК с линией ЭСК человека hESMK05.

Инфицирование, выделение и культивирование иПСК

Репрограммирование на начальных этапах сопровождается изменениями размера, формы клеток, организации цитоскелета и рецепторов. Сигналом того, что в трансфицированных клетках начался процесс репрограммирования, может служить появление клеток, визуально отличающихся от исходной культуры. Для повышения эффективности репро-

граммирования клеток мы использовали ингибитор гистоновых деацетилаз – вальпроевую кислоту [8], и инкубировали клетки в атмосфере 5% кислорода. На 8-е сут после лентивирусной трансфекции культуры клеток ДП мы наблюдали появление первых колоний морфологически измененных клеток (рис. 1В), что говорит о мезенхимно-эпителиальном переходе – одной из характеристик репрограммирования [12]. В это время среду для репрограммирования заменяли на mTeSR1 для поддержания недифференцированного состояния. Со временем размер колоний увеличивался и появлялись новые колонии. Практически все колонии имели ЭСК-подобную морфологию и четкие очертания. По морфологическим характеристикам полученные нами клоны практически не различались между собой. Клетки, образующие эти колонии, характеризовались высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, подобно ЭСК (рис. 1В).

Следующей нашей задачей стало отделение полностью репрограммированных клонов от частично репрограммированных, так как известно, что лишь небольшая часть морфологически сходных трансформированных колоний проходит весь путь репрограммирования до плюрипотентного состояния.

При отделении репрограммированных клеток от пула нерепrogramмированных часто исходят из морфологического сходства выделяемых клонов с ПСК, в которых при дальнейшем клонировании обычно вначале определяют экспрессию щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток [13, 14]. Затем клонируют колонии, положительные по щелочной фосфатазе. Так как экспрессия щелочной фосфатазы характерна для интактных клеток ДП [15], отбор клонов по этому критерию мы посчитали необоснованным, поскольку при положительном сигнале открытым оставался бы вопрос о том, обусловлена экспрессия щелочной фосфатазы в клетках их репрограммированием или сохранностью характеристики материнских клеток. С целью упрощения работы при отделении полностью репрограммированных иПСК на 21-е сут после инфицирования репрограммирующими факторами мы провели прижизненное иммуномечение против поверхностного антигена Tra-1-60, одного из маркеров плюрипотентных клеток [16], после чего механически отобрали Tra-1-60⁺ колонии. Учитывая, что репрограммирование является многоступенчатым процессом, мы выбрали окрашивание по Tra-1-60, потому что этот маркер появляется на более поздних стадиях приобретения клетками плюрипотентного статуса. Эти колонии были перенесены на культуральный пластик, покрытый фидерным слоем митотически инактивированных МЭФ. В дальнейшем клетки пассировали на пластик, покрытый матригелем.

Подтверждение недифференцированного состояния полученных иПСК

Щелочная фосфатаза, маркер плюрипотентных и стволовых клеток, экспрессируется в интактных клетках ДП и является индикатором индукционной способности ДП. Однако со временем в культуре многие белки, характерные для интактных клеток ДП, в том числе и щелочная фосфатаза, практически не детектируются, и индукционный потенциал клеток ДП исчезает [17]. Исследователи связывают потерю собственных характеристик и приобретение признаков интерфолликулярных фибробластов отсутствием естественного для нативных клеток ДП микроокружения в культуре. На шестом пассаже (три пассажа до инфицирования *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* и три пассажа после инфицирования) мы детектировали в выделенных кломах репрограммированных клеток экспрессию щелочной фосфатазы (рис. 1Г), в то время как в исходной культуре ДП (рис. 1Д) на этом же пассаже ее экспрессировали единичные клетки. Экспрессия щелочной фосфатазы указывает в основном на то, что в клетках идет процесс репрограммирования, но не обязательно отражает полностью репро-

граммированное состояние. Мы наблюдали образование колоний, положительных по данному маркеру, которые, однако, не стали истинными иПСК. Скорее всего, они подверглись неполному репрограммированию либо после приобретения плюрипотентности быстро дифференцировались, и мы не смогли зарегистрировать данный момент.

Выделенные колонии были положительными по щелочной фосфатазе и при длительном культивировании. С помощью иммуоцитохимического окрашивания было выяснено, что исследуемые клоны репрограммированных клеток экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (рис. 1Е–Л), а также поверхностные антигены SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81 (рис. 1М–П). Для дальнейшей работы мы выбрали один клон иДПК, положительный по всем перечисленным маркерам.

Однако данные иммуоцитохимического окрашивания не отображают количественной характеристики особенностей полученных иДПК. Поэтому для определения процентного содержания иПСК в культуре, экспрессирующих перечисленные выше поверхностные маркеры плюрипотентности, мы использовали метод проточной цитофлуориметрии (рис. 2А). Практически все иДПК были положительными по SSEA4 (99.28%), Tra-1-60 экспрессировали 78.36% иДПК, Tra-1-81 – 67.39% и больше половины популяции иДПК (53.94%) были положительными по SSEA3. Из приведенных данных видно, что при репрограммировании не все клетки клона начинают экспрессировать антигены плюрипотентного статуса SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81, однако, доля этих клеток велика (от 53 до 99%). Показано, что отобранные нами репрограммированные иДПК экспрессируют SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81, которые практически не детектируются в исходных клетках ДП. Так как исходные клетки не экспрессируют рассматриваемые маркеры плюрипотентности, а полученные нами иДПК положительны по ним, очевидно, что эти клетки подверглись репрограммированию.

С помощью метода наименьших квадратов мы определили среднее время удвоения популяции иДПК, оно составило 25 ч. Таким образом, полученные клоны иДПК имели сходную с ЭСК кинетику роста (среднее время удвоения популяции ЭСК – 25 ч). На пятом пассаже иДПК имели нормальный диплоидный кариотип 46, XX (рис. 2Б).

Еще одно условие репрограммирования клеток до плюрипотентного состояния – реактивация теломеразы. Известно, что в соматических клетках теломераза не активна, а при репрограммировании происходит ее реактивация. Теломераза обладает активностью обратной транскриптазы, удлиняющей теломерные участки ДНК клетки. С помощью TRAP-

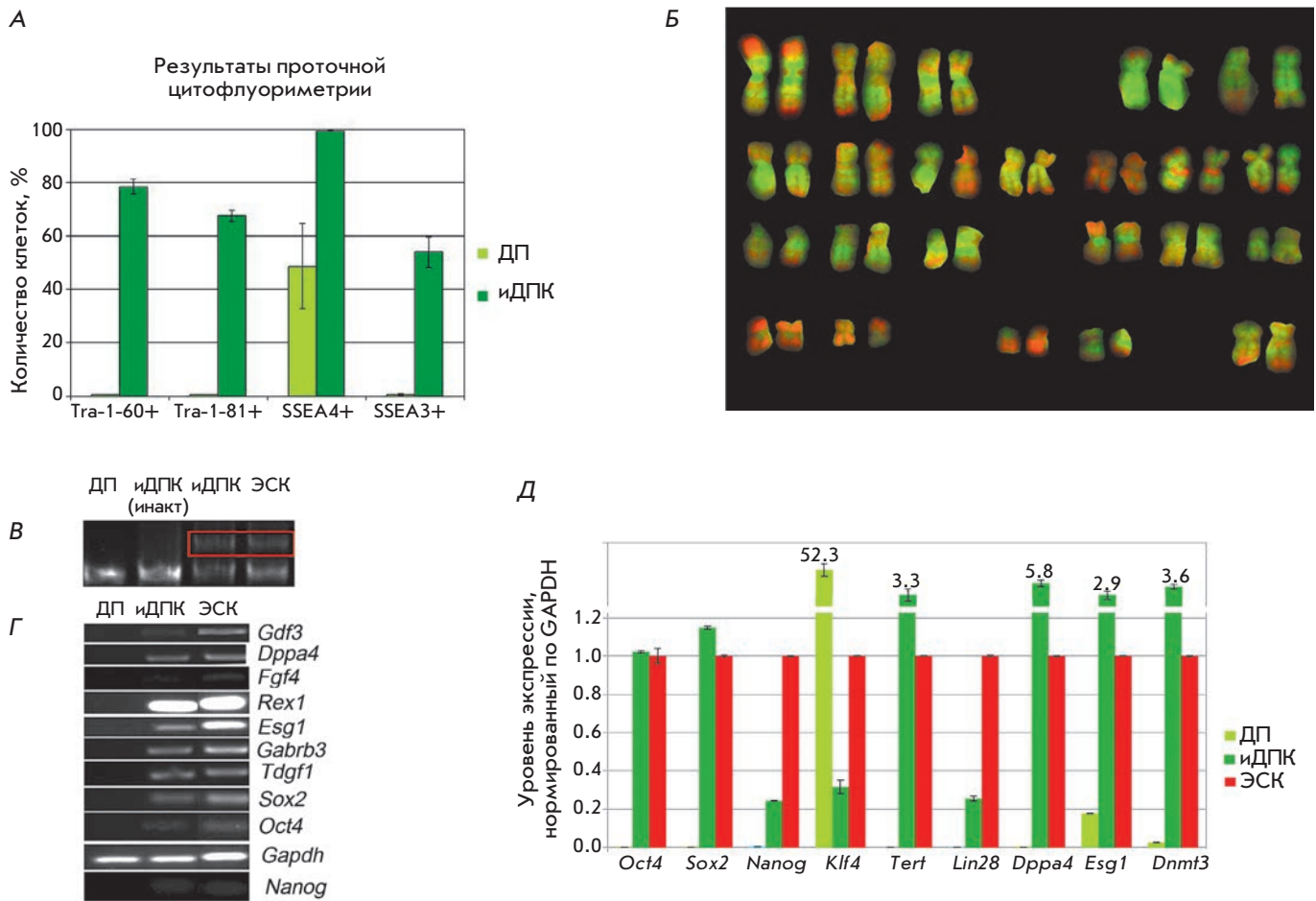


Рис. 2. Соотношение исходных (ДП) и репрограммированных (идПК) клеток, экспрессирующих маркеры плюрипотентности Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA3, SSEA4, по результатам проточной цитофлуориметрии (А). Нормальный диплоидный кариотип идПК (46, XX) (Б). Хромосомы окрашены DAPI (зеленый цвет) и 7-ААД (красный цвет). Реактивация теломеразы в идПК (В). Теломераза активна в образцах на дорожках, в которых детектируются дополнительные полосы, соответствующие теломерным повторам (идПК, ЭСК). Образцы ЭСК и идПК, прогретые до инактивации теломеразы – идПК(инакт), выступают в качестве контроля. В исходной культуре идПК (идПК) теломераза не активна. Экспрессия генов раннего развития (названия справа) по данным ОТ-ПЦР (Г). Результаты определения уровней экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Tert*, *Klf4*, *Lin28*, *Dppa4*, *Esg1*, *Dnmf3* в клетках ДП, идПК и ЭСК методом ПЦР в реальном времени (Д)

ПЦР-анализа мы выяснили, что в полученных нами идПК теломераза активна (рис. 2В), что не удивительно, так как исследуемые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом. В исходной культуре ДП этот фермент не активен. Следовательно, в идПК произошла реактивация теломеразы в процессе репрограммирования. По активности теломеразы, полученные идПК, были подобны ЭСК.

С помощью ОТ-ПЦР-анализа мы обнаружили в культурах иПСК транскрипты генов (*Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Tdgf1*, *Gabrb3*, *Esg1*, *Rex1*, *Fgf4*, *Dppa4*, *Gdf3*), которые работают в раннем развитии и являются маркерами ПСК (рис. 2Г). В исходной культуре ДП транскрипты этих генов не детектировались, а по-

явление положительных сигналов в идПК указывает на их активацию при репрограммировании. Скорее всего, *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* активируют другие гены раннего развития. Ключевая роль перечисленных факторов при репрограммировании подтверждается полученными нами результатами.

Чтобы выявить индивидуальные особенности культуры, мы использовали метод ПЦР в реальном времени (рис. 2Д). Хотя уровни экспрессии практически всех исследуемых генов в идПК и ЭСК сопоставимы и отличаются от профиля экспрессии в нерепrogramмированных клетках ДП, нам все же удалось установить некоторые особенности исследуемых клеточных культур.

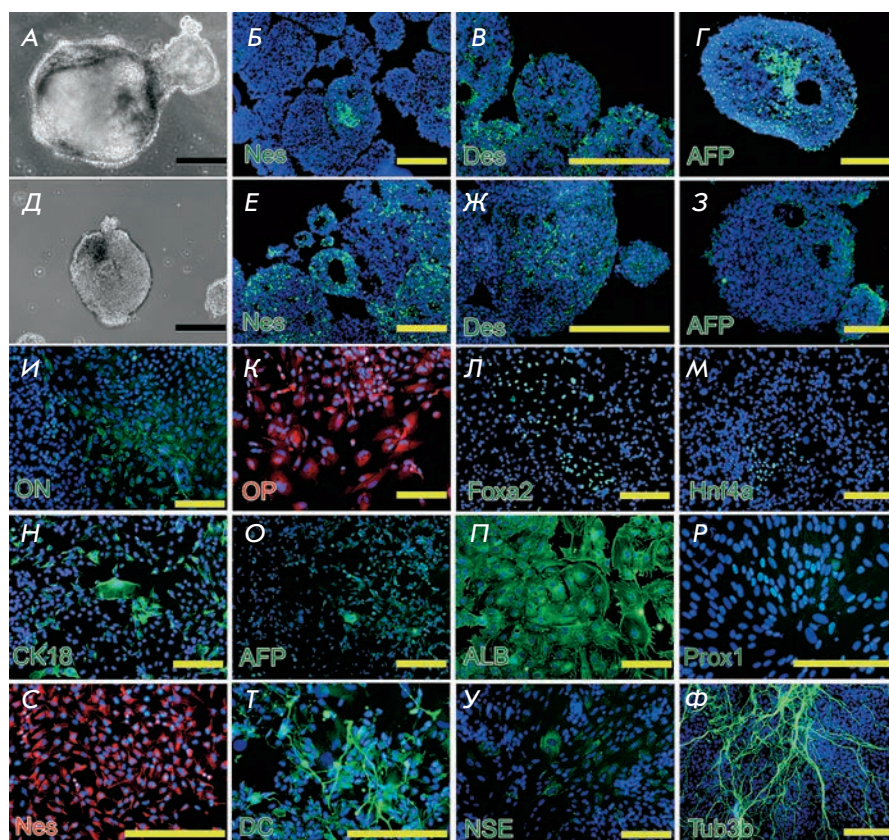


Рис. 3. Дифференцировка иДПК *in vitro*. Образование и характеристика эмбрионных тел (ЭТ) из иДПК (А–Г) и из ЭСК в качестве контроля (Д–З). Морфология ЭТ из иДПК (А) и ЭТ из ЭСК (Д). Экспрессия маркеров трех зародышевых листков: нестина (Nes), десмина (Des) и альфа-фетопротеина (AFP) в ЭТ, полученных из иДПК (Б–Г) и ЭСК (Е–З). Результаты направленной дифференцировки иДПК (И–Ф). Экспрессия маркеров остеогенной дифференцировки остеонектина (И) и остеопонтина (К). Экспрессия маркеров гепатоцитарной дифференцировки Foxa2 (Л), Hnf4α (М), цитокератина 18 (Н), альфа-фетопротеина (О) и альбумина (П). Экспрессия маркеров нейрональной дифференцировки Psox1 (Р), нестина (С), даблкортина (Т), нейрон-специфичной енолазы (У), β-III-тубулина (Ф). Масштабный отрезок 200 мкм

Следовательно, по проверенным характеристикам полученные нами репрограммированные клетки отвечают критериям недифференцированного статуса. Для дальнейшей характеристики полученных иДПК нам необходимо было оценить их дифференцировочный потенциал.

Определение дифференцировочного потенциала иДПК

Из иДПК мы получили эмбрионные тельца, которые в лабораторных условиях напоминают первые этапы эмбриогенеза (рис. 3А). ЭТ представляют собой самоорганизующиеся округлые агрегаты с внутренней полостью. В ЭТ из иДПК, как и в ЭТ, образованных из ЭСК (рис. 3Д–З), мы детектировали белки эктодермы (нестин), мезодермы (десмин) и энтодермы (альфа-фетопротеин) (рис. 3Б–Г).

Благодаря способности к дифференцировке в лабораторных условиях ПСК могут использоваться для изучения процессов раннего развития и направленной дифференцировки клеток в те или иные ткани. Мы подобрали условия дифференцировки иПСК в экто- (нейродифференцировка), мезо- (остеогенная дифференцировка) и в энтодермальном направлении (гепатоцитарная дифференцировка).

Остеогенная дифференцировка

Спустя 2–3 недели после индукции остеогенной дифференцировки иДПК мы выявили белки внеклеточного матрикса – остеопонтин (рис. 3К) и остеонектин (рис. 3И), которые считаются маркерами остеобластов и принимают участие в минерализации кости.

Дифференцировка в гепатоцитарном направлении

Дифференцировку в гепатоцитарном направлении проводили в течение 3–5 недель, после чего в иДПК начинали экспрессироваться ядерные факторы транскрипции Foxa2 (маркер дефинитивной энтодермы) и Hnf4α (маркер экстраэмбриональной энтодермы). Положительные по этим факторам клетки располагались группами примерно по 50–100 (рис. 3Л,М). Появлялась экспрессия альфа-фетопротеина, указывающая на коммитирование клеток в гепатобласт, и эпителиального маркера цитокератина 18 (СК18), характеризующего приобретение клетками более дифференцированного статуса (рис. 3Н,О). После дифференцировки в клетках начинается экспрессия альбумина (рис. 3П), что свойственно зрелым гепатоцитам.

Дифференцировка в нейрональном направлении

Дифференцировку в нейрональном направлении проводили в течение 3–5 недель. С помощью имму-

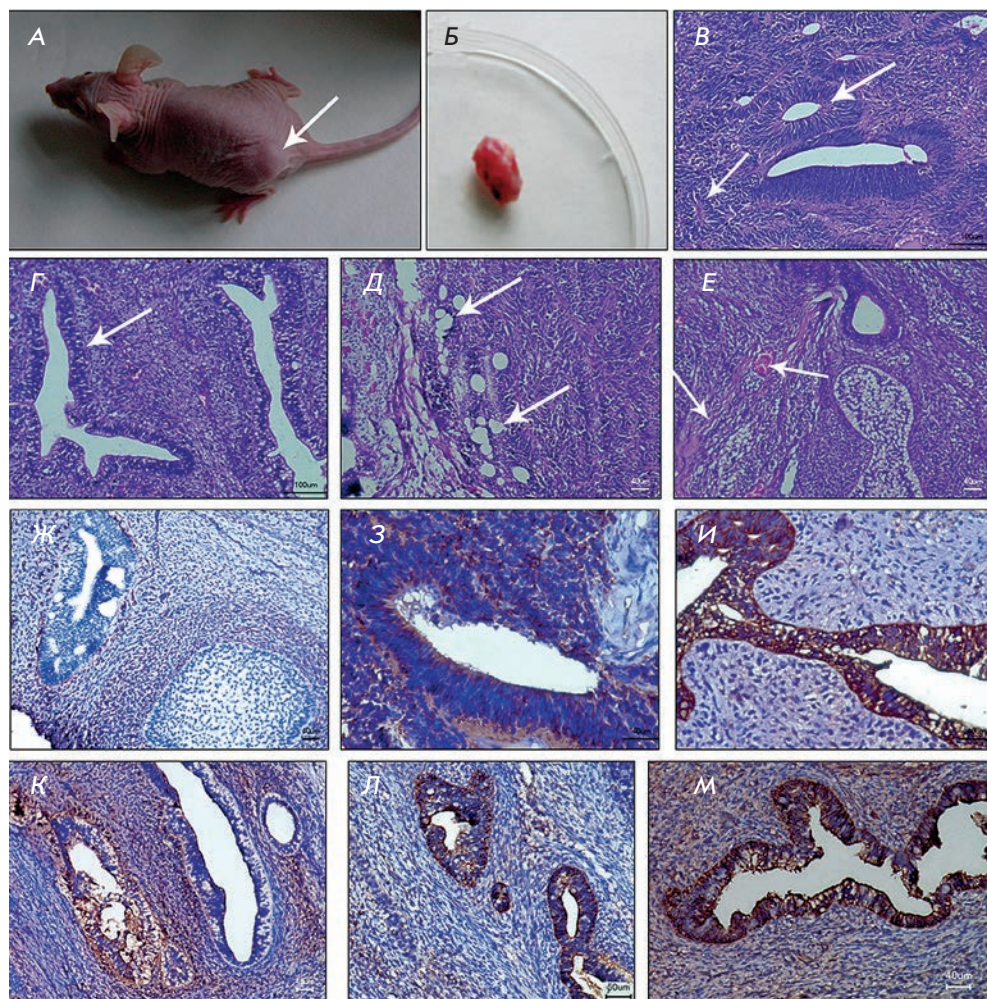


Рис. 4. Образование тератом из иДПК. Фотографии (А) реципиентной мыши спустя 6 недель после введения иДПК (стрелкой указана тератома) и (Б) вырезанной тератомы. Фотографии парафиновых срезов тератом, окрашенных гематоксилином и эозином (В–Е). В – нейроглия (нейроэпителиальные трубочки и розетки указаны стрелками); Г – железистый эпителий, Д, Е – мезэнхима (в препарате Д стрелкой указаны жировые клетки, в препарате Е стрелками указаны волокна рыхлой соединительной ткани и сосуды); окраска антителами против виментина (Ж), нестина (З), пан СК (И), СК8 (К), СК18 (Л), AFP (М)

ноцитохимического окрашивания мы обнаружили, что иДПК, дифференцированные в нейрональном направлении, экспрессировали *Prox1* (рис. 3Р), который, возможно, играет фундаментальную роль в развитии ЦНС, принимая участие в регуляции экспрессии и развития постмитотических недифференцированных предшественников нейронов. Нейрональные иДПК были положительными по нестину (НСК) – маркеру нейральных стволовых клеток (рис. 3С), и даблкортину (ДС) – маркеру незрелых нейронов (рис. 3Т), а также образовывали сплетения клеток с длинными отростками, положительными по маркеру зрелых нейронов, β -III-тубулину (рис. 3Ф), и окрашивались на нейронспецифичную енолазу (NSE) (рис. 3У).

Дифференцировка иПСК *in vivo*

Один из достоверных тестов, доказывающих плюрипотентность клеток, – их способность образовывать тератому после введения бестимусным мышам. Тератома представляет собой опухоль, состоящую из не-

скольких типов тканей, обычно производных трех зародышевых листков, присутствие которых не свойственно тем органам или анатомическим областям организма, в которых развивается опухоль. Данные об эффективности образования тератом, в зависимости от места инъекции недифференцированных ПСК, весьма неоднозначны. Например, в работе Prokhorova и соавт. [18] говорится о сайт-специфичности образования тератом из одних и тех же клеток, другие же авторы не находят разницы в эффективности теста на тератомообразование при введении ПСК в разные области тела реципиента [19]. Мы выбрали наименее трудоемкий метод введения иДПК под кожу спины и задней лапки. Спустя 3–6 недель на месте инъекции недифференцированных иДПК наблюдали образование тератомы (рис. 4А,Б). По гистологическому строению опухоль представляла собой незрелую тератому, в которой обнаруживались структуры экто-, мезо- и энтодермального происхождения. На гистологических препаратах мезенхимные ткани характеризовались обилием капилляров, часть ко-

торых имела расширенные просветы, между ними располагались волокна рыхлой соединительной ткани (рис. 4Е). Кроме того, обнаружены крупные клетки с пенистой цитоплазмой (рис. 4Д), что, возможно, указывает на формирование в тератоме жировой ткани. На препаратах видны обширные участки железистого эпителия (рис. 4Г), а также участки незрелой нервной ткани, состоящие из мелких гиперхромных клеток с узким ободком цитоплазмы. Также были обнаружены структуры, напоминающие примитивные нейроэктодермальные розетки и трубочки (рис. 4В). С помощью иммуногистохимического анализа подтверждена подлинность получения тератомы из иДПК. В препаратах выявлены виментинбогатые участки, расположенные в тканях между протоками (рис. 4Ж). Нестин был обнаружен в структурах, напоминающих нейроэктодермальные розетки и трубочки (рис. 4З). Мы наблюдали большое количество железистых структур, в которых экспрессировались панцитокератин, цитокератины 8 и 18, а также альфа-фетопротейн (рис. 4И–М).

Эффективность репрограммирования в работе [6] составила $\approx 0.02\%$, тогда как в нашем исследовании $\approx 0.03\%$. Скорее всего, эта разница не значительна и связана с разными методиками, применяемыми

в разных лабораториях. Однако также возможно, что результат нашей работы свидетельствует о положительном влиянии на эффективность репрограммирования условий культивирования при низком содержании кислорода и добавлении вальпроевой кислоты (поскольку Higgins и соавт. [6] не сообщают об использовании этих компонентов в своих экспериментах). Таким образом, данные этих двух работ сопоставимы и дополняют друг друга.

Учитывая происхождение использованных клеток ДП от нервного гребня, представляет интерес дальнейшее изучение полученной линии иДПК, включающее ее эпигенетические характеристики и тенденции к спонтанной нейрональной дифференцировке *in vitro* в сравнении с линиями иПСК, полученными из других источников. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт № 8796 от 04.10.2012 (КАДРЫ 1.2.2), государственный контракт № 16.740.11.0637 от 02.07.2011 (КАДРЫ 1.3.1 и государственный контракт № 14.512.11.0040 от 03.04.2013 (Технологии и разработки)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oliver R.F. // J. Embryol. Exp. Morphol. 1967. V. 18. № 1. P. 43–51.
- Ohuama M., Kobayashi T., Sasaki T., Shimizu A., Amagai M. // J. Cell Sci. 2012. V. 125. P. 4114–4125.
- Шутова М.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 2. С. 104–106.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Лисковых М.А., Чуйкин И., Ранян А., Сафина Д.А., Толкунова Е.Н., Минаева Ю.М., Жданова Н.С., Дыбан П.А., Маллинс Дж., Костылева Е.И. и др. // Цитология. 2011. Т. 53. № 12. С. 927–934.
- Higgins C., Ito M., Inoue K., Richardson G., Jahoda K., Cristiano A. // Exp. Dermatol. 2010. V. 19. № 6. P. 568.
- Higgins C., Ito M., Inoue K., Richardson G., Jahoda K., Cristiano A. // J. Invest. Dermatol. 2012. V. 136. № 6. P. 1725–1727.
- Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // Stem Cells Dev. 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
- Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., et al. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 5. P. 618–630.
- Чермных Э.С., Радюхина Н.В., Руткевич П.Н., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. // Цитология. 2010. Т. 52. № 3. С. 219–224.
- Ohnuki M., Takahashi K., Yamanaka S. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 2009. Chapter 4:Unit 4A.2. doi: 10.1002/9780470151808.sc04a02s9.
- Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H., He W., Chen J., Li F., Zhuang Q., et al. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 1. P. 51–63.
- Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R., et al. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 6. P. 472–476.
- Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // PLoS One. 2009. V. 4. № 9. e7076.
- Гнедева К.Ю. Клетки дермальной папиллы из нервного гребня в морфогенезе волосяного фолликула. М.: ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, 2012.
- Yehezkel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y., Tzukerman M., Shaked R., Huber I., Gepstein L., Skorecki K., Selig S. // Epigenetics. 2011. V. 6. № 1. P. 63–75.
- Rendl M., Polak L., Fuchs E. // Genes Dev. 2008. V. 22. № 4. P. 543–557.
- Prokhorova T.A., Harkness L.M., Frandsen U., Ditzel N., Schroder H.D., Burns J.S., Kassem M. // Stem Cells Dev. 2009. V. 18. № 1. P. 47–54.
- Zhang W.Y., de Almeida P.E., Wu J.C. // Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. StemBook, 2012. doi/10.3824/stembook.1.53.1, http://www.stembook.org.

УДК 576.3

Система для изучения бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

И. В. Честков^{1*}, Е. А. Васильева¹, С. Н. Иллариошкин², М. А. Лагарькова¹, С. Л. Киселев¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Научный центр неврологии РАМН, 125367, Москва, Волоколамское ш., 8

*E-mail: ichestkov@vigg.ru

Поступила в редакцию 09.09.2013

РЕФЕРАТ Технология генетического репрограммирования позволяет получать плюрипотентные стволовые клетки индивидуально для каждого пациента. Эти клетки, названные индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК), могут стать неограниченным ресурсом для получения специализированных типов клеток. Таким образом, появляется возможность использования аутологичных соматических клеток в заместительной терапии, а также создания *in vitro* моделей для изучения механизмов патогенеза заболеваний и поиска новых лекарственных препаратов. Боковой амиотрофический склероз (БАС) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, при котором наблюдается поражение верхних и нижних двигательных (моторных) нейронов. Примерно в 10% случаев БАС генетически наследуется, и самая распространенная семейная форма этого заболевания ассоциирована с мутациями в гене *SOD1*. Мы использовали технологию репрограммирования для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с семейными формами БАС. Пациент-специфические иПСК получали при помощи интеграционных и неинтеграционных методов доставки транскрипционных факторов репрограммирования. Эти линии иПСК обладали свойствами плюрипотентных клеток и были способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз, дифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, моторные нейроны.

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС, также известный как болезнь моторных нейронов, болезнь Шарко, болезнь Лу Герига) – это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с поздним началом, при котором наблюдается специфическая гибель моторных нейронов спинного и головного мозга. В ходе развития заболевания происходит постепенная деиннервация мышц, и смерть наступает в результате поражения дыхательной мускулатуры. На сегодняшний день не существует эффективной ранней диагностики БАС, поэтому от момента появления первых симптомов до смерти больного проходит не более 5 лет. Большинство случаев БАС (приблизительно 90%) не имеют явной генетической наследуемости и характеризуются как спорадические. Наиболее распространенная семейная форма БАС (ALS1, 20% от всех семейных случаев) ассо-

циирована с аутосомно-доминантными мутациями в гене Cu/Zn-супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*). Охарактеризовано более 170 мутаций в гене *SOD1*, которые приводят к развитию БАС (база данных ALSod от 28.06.2013).

Однако связь между генетическим дефектом и гибелью моторных нейронов до сих пор не обнаружена. Введение в мышей мутантного аллеля гена *SOD1* человека позволило воспроизвести основные симптомы нейродегенерации при БАС и проверить ряд гипотез о патогенетических основах этого заболевания. Было показано, что токсическое действие *SOD1* на моторные нейроны не связано с нарушением или потерей ферментативной активности. У животных, несущих как активные (h*SOD1*^{G37R} [1], h*SOD1*^{G93A} [2]), так и неактивные (h*SOD1*^{G85R} [3], h*SOD1*^{G127X} [4]) формы фермента, симптомы были сходными с симптомами при БАС, включая потерю

синаптических контактов моторных нейронов [5], нарушение митохондрий [6] и активацию глиальных клеток [7]. Более того, мыши с гомозиготным нокаутом гена *SOD1* не имели никаких признаков нейродегенеративных нарушений [8].

Каталитическая активность *SOD1* зависит от присутствия в активном центре иона меди. Находясь в свободном состоянии, этот ион проявляет крайнюю реакционноспособность и токсичность, поэтому неэффективная доставка в активный центр *SOD1* или нарушение связывания за счет конформационных изменений фермента (в результате мутаций) могут стать причиной внутриклеточных нарушений и гибели моторных нейронов. Однако удаление специализированного шаперона-переносчика меди для *SOD1* (CCS) [9] или мутации в Cu-связывающем сайте фермента [10] не снижали токсическое действие на моторные нейроны у мышей.

Тем не менее конформационные нарушения и токсичность мутантного *SOD1* рассматриваются в настоящее время как основная причина возникновения БАС. В результате утраты ионов меди и цинка, разрыва внутримолекулярных дисульфидных связей происходит диссоциация гомодимерного нативного фермента на мономеры и формируются белковые агрегаты – один из признаков классического БАС [11]. Более того, обнаружение таких белковых агрегатов в моторных нейронах большинства пациентов со спорадическими формами БАС указывает на олигомеризацию *SOD1* как на общую черту данного заболевания независимо от его генотипа [12]. В поддержку конформационной теории говорит и существование форм с различным проявлением и скоростью прогрессии в зависимости от мутации в гене *SOD1*.

Следует отметить, что гибель моторных нейронов при БАС может не быть автономным клеточным процессом, поскольку экспрессия мутантного гена *SOD1* только в мотонейронах не приводит к появлению признаков нейродегенерации у трансгенных мышей [13], в то время как токсический эффект показан для астроцитов [14] и клеток микроглии [7].

Однако результаты, полученные на трансгенных животных, не всегда можно прямо перенести на человека, а системы с повышенной экспрессией мутантного гена *SOD1* могут не воспроизводить действительную картину заболевания на молекулярном уровне. При этом изучение БАС у человека затрудняется труднодоступностью пораженных тканей. Технология генетического репрограммирования позволяет перевести практически любые доступные клетки пациента, например фибробласты кожи [15], эндотелиальные клетки [16, 17], в плюрипотентное состояние. Полученные при этом индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) обладают

всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), включая неограниченный пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке во все типы клеток организма.

В представленной работе получены иПСК для пациентов с семейными формами *SOD1*-ассоциированного БАС путем репрограммирования первичных фибробластов кожи с помощью эктопической экспрессии генов четырех транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4. Полученные линии иПСК охарактеризованы, разработана методика их дифференцировки в моторные нейроны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение культуры фибробластов кожи

Биоптаты кожи размещали под покровные стекла на чашках Петри (Greiner Bio-One), покрытых 0.1% раствором желатина (Sigma), и культивировали в питательной среде DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (Hyclone), 1% раствора заменимых аминокислот (Invitrogen), 2 mM L-глутамин (Invitrogen), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), 4 нг/мл hrbFGF (PeproTech) (среда для фибробластов). При достижении конфлюэнтного монослоя, образующегося примерно на 14 день, клетки пассировали путем обработки 0.25% раствором трипсина (Hyclone). С целью длительного хранения культуры фибробластов клетки замораживали в DMEM с добавлением 20% FBS и 10% ДМСО.

Клеточные культуры

Первичные линии фибробластов кожи культивировали как описано выше. Клетки упаковывающей линии Phoenix культивировали в DMEM с добавлением 5% FBS, термически инактивированной (56°C), 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина на чашках Петри, покрытых 0.1% раствором желатина. Линии иПСК культивировали в среде mTeSR1 (STEMCELL Technologies) на чашках Петри, покрытых матригелем (Matrigel, BD). Все клеточные линии культивировали в 5% CO₂ при 37°C.

Получение рекомбинантных лентивирусов

Рекомбинантные лентивирусы получали путем трансфекции упаковывающей клеточной линии Phoenix лентивирусными векторами, кодирующими репрессирующие факторы: LeGO-hOct3/4, LeGO-hSox2, LeGO-hKlf4, LeGO-hc-Myc по ранее описанной методике [18].

Трансфекция фибробластов и получение иПСК

Репrogramмирование фибробластов неинтеграционным способом проводили с использова-

нием CytoTune-iPS Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для репрограммирования рекомбинантными лентивирусными частицами фибробласты на первом пассаже рассеивали на 6-луночный планшет (Greiner Bio-One) по 100000 клеток каждой первичной линии на лунку и инкубировали в среде для фибробластов в течение ночи. На следующий день клеткам заменяли среду на свежую, содержащую 8 мкг/мл полибрена (Sigma), инкубировали в течение 1 ч, затем добавляли вирусные частицы всех четырех типов с множественностью заражения 5 для каждого лентивируса. Смену среды проводили 1 раз в 2 дня. На пятый день с момента трансфекции фибробласты, обработанные 0.25% раствором трипсина, пересеивали на подложку из митотически инактивированных митомицином C (10 мкг/мл, Sigma) эмбриональных фибробластов мыши на 10-см чашки Петри, предварительно покрытые 0.1% раствором желатина. На шестой день среду для фибробластов заменяли средой для культивирования ЭСК человека следующего состава: DMEM/F12 (1 : 1) («ПанЭко»), 20% заменителя сыворотки Knockout Serum Replacement (KO SR, Invitrogen), 1% NEAA, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, 0.1 mM β-меркаптоэтанола (Sigma), 4 нг/мл hrbFGF, содержащую ингибитор гистон-метилтрансферазы VIX-01294 (1 мкМ, Sigma), ингибитор деацетилазы гистонов вальпроевую кислоту (1 mM, Sigma). Смену среды осуществляли ежедневно. VIX-01294 и вальпроевую кислоту добавляли в среду в течение 7 дней. Колонии, морфологически не отличимые от колоний ЭСК, были отобраны механически и помещены на подложку из матригеля в среду mTeSR1.

Визуализация активности эндогенной щелочной фосфатазы

С чашек Петри отбирали среду, клетки промывали 2 раза буферным раствором следующего состава: 100 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20, pH 9.5. Затем буферный раствор отбирали и добавляли рабочий раствор: 0.02% BCIP, 0.03% NBT в 0.1 M буфере TBS (Tris-Buffered Saline), pH 9.5. Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали 2 раза буферным раствором и проводили микроскопический анализ с подсчетом позитивно окрашенных колоний.

Кариотипирование и иммуноокрашивание

Препараты метафазных хромосом линий iPSC и иммуноокрашивание проводили как описано в [17].

В качестве первичных антител использовали: мышиные моноклональные антитела к SSEA-4 (1 : 100),

TRA-1-60 (1 : 100), TRA-1-81 (1 : 50) (Cell Signaling Technology); к HB9 (1 : 50, Developmental Hybridoma Bank или DSHB); к βIII-тубулину (1 : 500, Abcam); к виментину (1 : 200, Dako); кроличьи моноклональные антитела против Nanog (1 : 200), Oct4 (1 : 300), Sox2 (1 : 400) (Cell Signaling Technology); кроличьи поликлональные антитела против ChAT, βIII-тубулина, GFAP (1 : 500, Abcam); против α-фетопротейна (1 : 400, Dako). В качестве вторичных антител использовали антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1 : 700), и антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1 : 500).

Для окрашивания ядер использовали DAPI. Препараты анализировали на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Цветные фотографии микрообъектов в псевдоцветах получали с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss).

Формирование эмбрионных тел и дифференцировка *in vitro*

Спонтанную дифференцировку плюрипотентных клеток индуцировали по ранее описанной методике [18].

Нейрональная дифференцировка

Для получения мотонейронов *in vitro* использовали протокол дифференцировки [19] с некоторыми модификациями. Эмбрионные тельца получали с помощью планшета AggreWell400 (STEMCELL Technologies) в среде DMEM/F12 с добавлением 5% заменителя сыворотки Knockout Serum Replacement (KO SR), 1% NEAA, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, 0.1 mM β-меркаптоэтанола, 200 нг/мл рекомбинантного белка Noggin человека (Biological Industries) и 2 мкМ SB431542 (Stemgent) в течение 12 дней. Затем в течение 10 дней эмбрионные тельца культивировали в Neurobasal Medium (Gibco) с добавлением 2 mM L-глутамин, B27 (Gibco), 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 нг/мл рекомбинантного Sonic hedgehog (PeproTech), 10 нг hrbFGF, после чего переносили на чашки Петри, покрытые матригелем в Neurobasal Medium, содержащей 2 mM L-глутамин, по 10 нг/мл BDNF, GDNF (все от PeproTech) и культивировали еще в течение 14 дней. Прикрепленные колонии обрабатывали аккутазой (Sigma), разбивали до одноклеточной суспензии и культивировали на чашках Петри, покрытых матригелем в течение 5 дней, после чего проводили иммуноокрашивание.

Направленную дифференцировку плюрипотентных клеток в астроциты проводили как описано в [20].

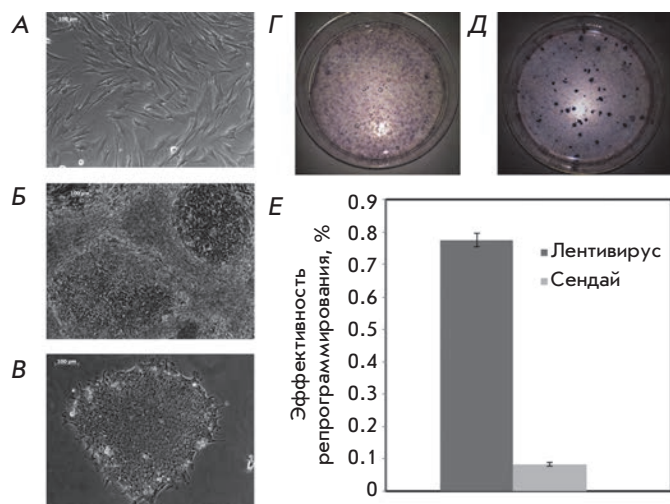


Рис. 1. Получение стабильных линий иПСК и определение эффективности репрограммирования первичных фибробластов кожи пациентов с семейными формами БАС. *А* – первичная культура фибробластов кожи; *Б* – формирование колоний иПСК на 15 день после введения генов репрограммирующих факторов; *В* – колония иПСК в бесфидерных условиях культивирования после механического отбора; *Г*, *Д* – визуализация колоний иПСК, полученных с помощью лентивирусных частиц (*Г*) и рекомбинантного вируса Сендай (*Д*), при окраске на активность эндогенной щелочной фосфатазы; *Е* – сравнение эффективности репрограммирования при использовании двух систем

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое репрограммирование фибробластов кожи больных семейной формой БАС

Биоптаты кожи пациентов с охарактеризованными формами БАС были предоставлены Научным центром неврологии РАМН. Из материала биопсий были получены гомогенные культуры первичных фибробластов кожи. Миграция клеток из кожных эксплантов происходила в течение 2 недель до формирования первого монослоя. Не позднее 1–2 пассажа в клеточные культуры с помощью лентивирусной системы доставки или рекомбинантных вирусов Сендай были введены гены четырех факторов транскрипции – *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*. Для повышения эффективности генетического репрограммирования в среду культивирования добавляли низкомолекулярные соединения: ингибитор гистон-метилтрансферазы (VIX-01294) [21] и ингибитор деацетилазы гистонов (вальпроевая кислота) [22]. Индукция плюрипотентного состояния в соматических клетках сопровождается целым каскадом эпигенетических событий,

Сравнение профилей коротких tandemных повторов (КТП) первичных фибробластов кожи пациентов (ФЧ) с семейными формами БАС и полученных линий иПСК

КТП-маркер	ФЧ1	иПСК1.2	ФЧ2	иПСК2.2
AMEL	X Y	X Y	X X	X X
CSF1PO	10 14	10 14	10 12	10 12
D10S1248	13 14	13 14	14 15	14 15
D12S391	16 23	16 23	20 23	20 23
D13S317	11 12	11 12	11 11	11 11
D16S539	12 12	12 12	11 13	11 13
D18S51	15 15	15 15	13 14	13 14
D1S1656	13 17.3	13 17.3	12 16.3	12 16.3
D22S1045	15 16	15 16	15 16	15 16
D2S441	10 13	10 13	11 14	11 14
D3S1358	15 16	15 16	17 18	17 18
D5S818	11 11	11 11	12 13	12 13
D7S820	9 11	9 11	10 12	10 12
D8S1179	13 14	13 14	14 15	14 15
FGA	21 23	21 23	21 21	21 21
SE33	16 30.2	16 30.2	26.2 26.2	26.2 26.2
TH01	9 9.3	9 9.3	6 9.3	6 9.3
TPOX	9 11	9 11	8 8	8 8
vWA	17 18	17 18	17 18	17 18

включая метилирование промоторных участков генов, экспрессирующихся в терминально дифференцированных клетках; активацию генов плюрипотентного состояния при гипометилировании промоторов; глобальные изменения хроматина и реактивацию X-хромосомы, замолкающей при развитии организма [17]. Начиная с 11 дня после введения репрограммирующих генов происходило формирование компактных колоний, состоящих из активно делящихся клеток с увеличенным соотношением ядро/цитоплазма, по сравнению с изначальной культурой фибробластов (*рис. 1А,Б*). На основе морфологического сходства с ЭСК был проведен механический отбор индивидуальных колоний с целью создания стабильных линий иПСК (*рис. 1В*). При окраске на щелочную

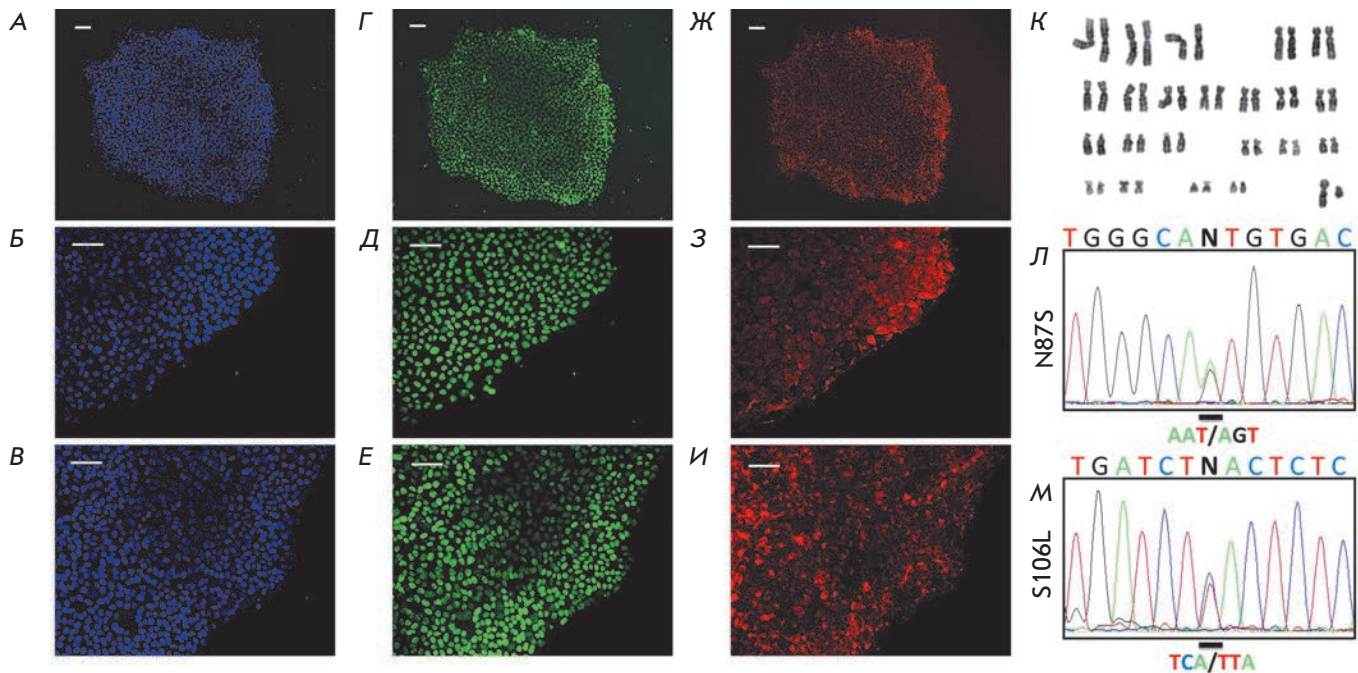


Рис. 2. Характеристика пациент-специфических линий иПСК. А–И – визуализация маркеров плюрипотентного состояния при иммуноцитохимическом окрашивании на транскрипционные факторы Oct3/4 (Г), Sox2 (Д), Nanog (Е) и поверхностные антигены SSEA-4 (Ж), TRA-1-60 (З), TRA-1-81 (И). Показано также окрашивание ядер клеток с помощью DAPI (А – В); К – кариотип линии иПСК, GTG-бэндинг; Л, М – результаты секвенирования, подтверждающие мутации в гене *SOD1*, в полученных иПСК

фосфатазу, активность которой возрастает в плюрипотентных клетках [23], мы обнаружили, что эффективность репрограммирования при использовании лентивирусной системы ($0.77 \pm 0.025\%$) в 10 раз выше, чем при использовании рекомбинантного вируса Сендай ($0.083 \pm 0.006\%$) (рис. 1Г,Д,Е). Кроме того, стабилизация плюрипотентного состояния в полученных с помощью вируса Сендай линиях иПСК, не содержащих трансгенов, происходила постепенно, в течение нескольких пассажей, что сопровождалось высоким процентом спонтанно дифференцированных клеток (данные не приведены). Тем не менее использование неинтеграционных методов позволяет получать генетически немодифицированные плюрипотентные клетки для каждого пациента, что важно в случае использования клеток как в заместительной терапии, так и при изучении патогенеза заболеваний, так как интеграция трансгенов в районы активного хроматина может привести к изменению экспрессии генов.

Характеристика пациент-специфических линий иПСК

Согласно результатам иммуноцитохимического окрашивания полученные линии иПСК экспрес-

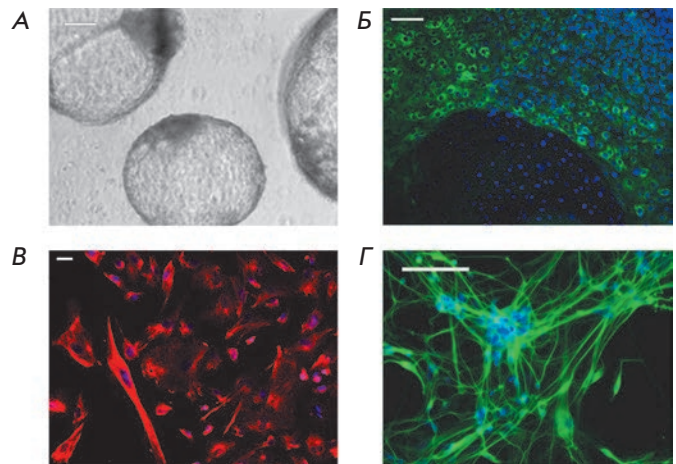


Рис. 3. Спонтанная дифференцировка иПСК в производные трех зародышевых листков. А – репрезентативная фотография эмбриоидных тел; Б, В, Г – иммуноцитохимическое окрашивание на α -фетопротейн (Б), виментин (В), β III-тубулин (Г). Ядра клеток окрашены DAPI (показано синим)

сируют специфические для ЭСК поверхностные антигены: SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, а также ядерные факторы транскрипции, ассоциированные с плюрипотентностью – Nanog, Oct4, Sox2 (рис. 2А–И). Анализ кариотипа линий иПСК методом GTG-бэндинга не выявил изменений в числе и структуре хромосом, возникших в процессе репрограммирования (рис. 2К). С целью определения способности иПСК к дифференцировке в производные трех зародышевых листков все анализируемые линии были помещены в суспензионную культуру, где образовывали трехмерные структуры – эмбриоидные тельца. После 14 дней культивирования эмбриоидные тельца переносили на покрытый желатином культуральный пластик для адгезии и последующей миграции клеток. Прикрепленные клетки обладали различной морфологией, и при иммуноцитохимическом окрашивании

были выявлены клеточные популяции, позитивные по βIII-тубулину (маркер эктодермы), виментину (маркер мезодермы) и α-фетопротейну (маркер энтодермы) (рис. 3).

Для подтверждения того, что полученные линии иПСК произошли именно из первичных фибробластов пациентов, мы проверили профили коротких tandemных повторов (КТП) этих линий клеток. Оказалось, что иПСК полностью совпадают с исходными линиями фибробластов по 18 КТП-маркерам (таблица). При этом в полученных линиях иПСК детектируется также генетическая причина БАС – мутация в гене *SOD1*, своя для каждого пациента (рис. 2Л,М).

Таким образом, по морфологическим признакам, экспрессии маркеров плюрипотентности, способности дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков линии иПСК, полу-

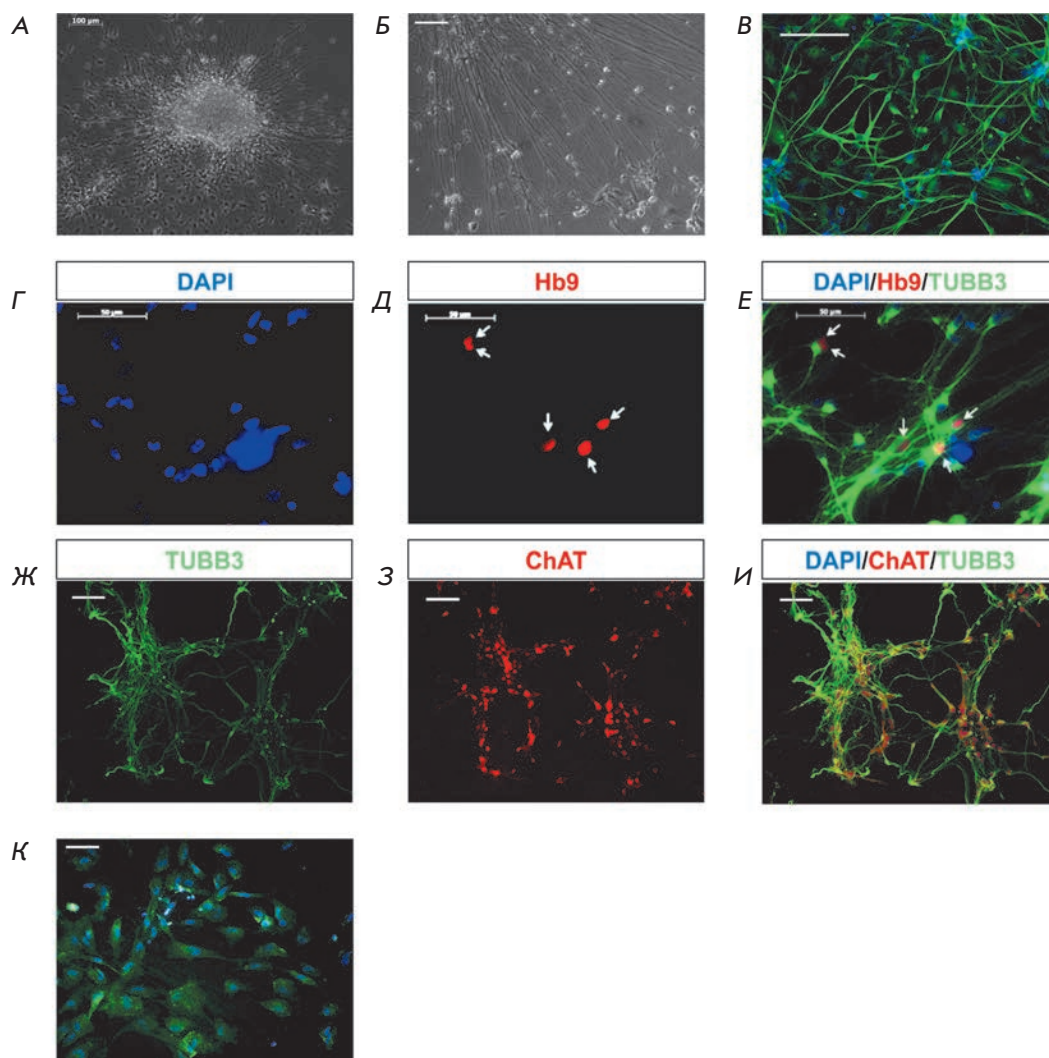


Рис. 4. Нейрональная дифференцировка пациент-специфических иПСК с мутациями в гене *SOD1*. А, Б – репрезентативные фотографии нейроподобных клеток при дифференцировке иПСК; В – иммуноцитохимическое окрашивание на общий нейрональный маркер βIII-тубулин (TUBB3); Г–И – визуализация маркеров моторных нейронов Hb9 (Д, Е) и ChAT (З, И); К – детекция белка GFAP при дифференцировке иПСК в астроциты. Ядра клеток окрашены DAPI (показано синим)

ченные из фибробластов кожи пациентов с SOD1-ассоциированным БАС, являются плюрипотентными.

Получение моторных нейронов из иПСК с мутациями в гене SOD1

Как показано ранее, гибель моторных нейронов при БАС может быть не автономным клеточным процессом, а зависеть от клеток микроокружения [7, 14]. Поэтому нашей дальнейшей задачей стала разработка протоколов дифференцировки иПСК в моторные нейроны и астроциты. Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что при развитии организма моторные нейроны формируются в результате воздействия на нейрональные прогениторные клетки двух последовательных сигналов: ретиноевой кислоты (каудализация) и Sonic hedgehog (вентрализация) [24]. Нейрональные предшественники были получены из суспензионных эмбрионидных телес с помощью ингибирования сигнального пути SMAD. Направленную дифференцировку в моторные нейроны проводили через 12 дней, добавляя в культуральную среду ретиноевую кислоту и рекомбинантный белок Sonic hedgehog. После диссоциации нейросфер до единичных клеток нейрональные предшественники переносили на чашки Петри, покрытые матригелем, и культивировали как прикрепленную культуру. Эти клетки экспрессируют общий нейрональный маркер βIII-тубулин, что доказывает нейрональное происхождение полученной популяции клеток (рис. 4А–В). На последнем этапе под воздействием нейроспецифических факторов роста BDNF и GDNF происходило созревание моторных нейронов. Иммуноцитохимический анализ показал, что в полученных культурах βIII-тубулин-позитивные нейроны коэкспрессировали такие маркеры, как Hb9 (или MNX1;

транскрипционный фактор, специфичный для моторных нейронов) и ChAT (холин-ацетилтрансфераза) (рис. 4Г–И). Таким образом, полученные линии пациент-специфических иПСК способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны, гибель которых происходит при БАС.

Кроме того, при дифференцировке линий иПСК в астроглиальном направлении мы идентифицировали клетки, экспрессирующие GFAP – основной маркер астроцитов (рис. 4К), токсический эффект которых показан при патологии БАС.

Таким образом, получены пациент-специфические линии иПСК, которые имеют преимущество перед другими опубликованными моделями [25], так как генетически идентичны изначальным клеткам пациентов и потенциально позволяют наиболее точно воспроизвести молекулярные события при развитии БАС. Кроме того, культивирование полученных линий иПСК в определенных, заданных условиях (среда mTeSR1) позволяет поддерживать плюрипотентное состояние клеток для стабильного и неограниченного получения моторных нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе получены иПСК для пациентов с SOD1-ассоциированным боковым амиотрофическим склерозом. Показано, что эффективность репрограммирования при использовании лентивирусной системы доставки генов в 10 раз выше, чем при использовании рекомбинантного вируса Сендай. Эти линии иПСК с мутациями в гене SOD1 плюрипотентны и способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-32018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wong P.C., Pardo C.A., Borchelt D.R., Lee M.K., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sisodia S.S., Cleveland D.W., Price D.L. // *Neuron*. 1995. V. 14. P. 1105–1116.
2. Howland D.S., Liu J., She Y., Goad B., Maragakis N.J., Kim B., Erickson J., Kulik J., DeVito L., Psaltis G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 1604–1609.
3. Bruijn L.I., Becher M.W., Lee M.K., Anderson K.L., Jenkins N.A., Copeland N.G., Sisodia S.S., Rothstein J.D., Borchelt D.R., Price D.L., et al. // *Neuron*. 1997. V. 18. P. 327–338.
4. Jonsson P.A., Ernhill K., Andersen P.M., Bergemalm D., Brannstrom T., Gredal O., Nilsson P., Marklund S.L. // *Brain*. 2004. V. 127. P. 73–88.
5. Frey D., Schneider C., Xu L., Borg J., Spooren W., Caroni P. // *J. Neurosci*. 2000. V. 20. P. 2534–2542.
6. Liu J., Lillo C., Jonsson P.A., Vande Velde C., Ward C.M., Miller T.M., Subramaniam J.R., Rothstein J.D., Marklund S., Andersen P.M., et al. // *Neuron*. 2004. V. 43. P. 5–17.
7. Boillee S., Yamanaka K., Lobsiger C.S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kassiotis G., Kollias G., Cleveland D.W. // *Science*. 2006. V. 312. P. 1389–1392.
8. Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.R., Wilcox H.M., Flood D.G., Beal M.F., Brown R.H. Jr., et al. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. P. 43–47.
9. Subramaniam J.R., Lyons W.E., Liu J., Bartnikas T.B., Rothstein J., Price D.L., Cleveland D.W., Gitlin J.D., Wong P.C. // *Nat. Neurosci*. 2002. V. 5. № 4. P. 301–307.
10. Wang J., Slunt H., Gonzales V., Fromholt D., Coonfield M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. // *Hum. Mol. Genet*. 2003. V. 12. P. 2753–2764.
11. Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P., Rouleau G.A. // *Ann. Neurol*. 2007. V. 62. № 6. P. 553–559.
12. Gruzman A., Wood W.L., Alpert E., Prasad M.D., Miller R.G., Rothstein J.D., Bowser R., Hamilton R., Wood T.D., Cleveland D.W., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 12524–12529.
13. Pramatarova A., Laganieri J., Roussel J., Brisebois K., Rouleau G.A. // *J. Neurosci*. 2001. V. 21. P. 3369–3374.

14. Nagai M., Re D.B., Nagata T., Chalazonitis A., Jessell T.M., Wichterle H., Przedborski S. // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. P. 615–622.
15. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell.* 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
16. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. № 2. P. 91–92.
17. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 937–946.
18. Shutova M.V., Chestkov I.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Springer Protocols Handbook ser.* 2012. P. 133–149.
19. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 145. P. 145.
20. Krencik R., Zhang S.C. // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. № 11. P. 1710–1717.
21. Shi Y., Desponts C., Do J.T., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
22. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
23. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creighton M.P., Steine E.J., Cassady J. P., Foreman R., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. № 2. P. 250–264.
24. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. // *Cell.* 2002. V. 110. № 3. P. 385–397.
25. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science.* 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.

УДК 571.27

Встраивание сигнала направления в лизосомы инвариантной цепи изменяет деградацию обратной транскриптазы ВИЧ-1, повышая ее иммуногенность

Е. С. Стародубова^{1*}, М. Г. Исагулянц², Ю. В. Кузьменко¹, О. А. Кротова^{1,2}, В. Л. Карпов¹¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32²НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

*E-mail: estarodubova@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.07.2013

РЕФЕРАТ Внутриклеточный процессинг антигена, кодируемого ДНК-вакциной, является одним из ключевых этапов формирования иммунного ответа. ДНК-иммунизация антигенами, искусственно направленными в эндосомно-лизосомный компартмент и на презентацию в составе МНС класса II, приводит к индукции сильного иммунного ответа. В представленной работе с целью повышения иммуногенности ДНК-конструкции на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1 создан химерный ген, который кодирует рекомбинантный белок с N-концевым коротким фрагментом инвариантной цепи молекулы МНС класса II человека, содержащим сигнал направления в лизосомы. Наличие этого сигнала привело к изменению локализации обратной транскриптазы и ускорению ее деградации в клетке. Деградация химерного белка происходила преимущественно за счет лизосомных протеаз. ДНК-иммунизация мышей линии BALB/c плазмидой, кодирующей химерный белок, привела к повышению иммунного ответа, что выразилось в более эффективной антигенспецифичной продукции Th1-цитокинов, IFN- γ и IL-2, спленоцитами иммунизированных животных. При этом большая часть спленоцитов продуцировала оба цитокина, т.е. была полифункциональной. Полученные данные показывают эффективность перенаправления антигена в лизосомы для улучшения ответа на ДНК-вакцинные антигены, обладающие исходно низкой иммуногенностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, ДНК-вакцина, инвариантная цепь, обратная транскриптаза, процессинг антигена.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Ii – инвариантная цепь молекул МНС класса II; IFN- γ – интерферон γ ; IL-2 – интерлейкин-2; RT – обратная транскриптаза.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-вакцинные антигены синтезируются в цитоплазме клетки, процессируются преимущественно протеасомой и презентуются на поверхности клетки в составе комплекса с молекулами МНС класса I, которые узнаются цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами [1]. В то же время в опытах на мышах показано, что для индукции эффективного иммунного ответа при ДНК-вакцинации необходима опосредованная молекулами МНС класса II активация CD4⁺ Т-клеток [2, 3]. В связи с этим для повышения эффективности ДНК-вакцин разрабатываются подходы по усилению CD4⁺ Т-клеточной составляющей

индуцируемого иммунного ответа [4, 5]. Один из таких подходов основан на повышении эффективности презентации кодируемых ДНК-вакциной антигенов в составе МНС класса II. Антигенные пептиды, представляемые молекулами МНС класса II, образуются в ходе протеолитического расщепления субстратов в лизосоме [6]. Усилить презентацию антигена в составе МНС класса II можно искусственно изменив деградацию ДНК-вакцинного антигена за счет введения сигнала лизосомной локализации [7].

Известно, что молекулы МНС класса II транспортируются в лизосомы в комплексе с инвариантной цепью (Ii), которая содержит на N-конце

сигнал направления в лизосомный компартмент [6]. Сигнальная последовательность расположена в N-концевой части белка (аминокислотные остатки 1–30), при этом ключевыми аминокислотами являются Leu7 и Ile8, а также Pro15, Met16 и Leu17 [8–10]. Установлено, что встраивание этого сигнала в другие белки способствует их направлению в лизосомы [11–15]. В данной работе для изменения процессинга обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 с целью повышения ее иммуногенности в составе ДНК-вакцины использовали сигнал инвариантной цепи МНС класса II человека [16, 17]. Добавление сигнала инвариантной цепи привело к изменению локализации RT в клетке с цитоплазматической на преимущественно лизосомную и увеличению скорости ее деградации лизосомными протеазами. Изменение локализации и деградации RT с сигналом инвариантной цепи привело к повышению иммуногенности RT или химерной RT в экспериментах по ДНК-иммунизации мышей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование ДНК-конструкций

Плазмида рКСМV2RT, кодирующая обратную транскриптазу ВИЧ-1 подтипа В (HXB2), получена при клонировании гена *RT* в вектор рКСМV [18] по сайтам SalI и EcoRI. Ген *RT* получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду рСМVRT [19]. Амплификацию проводили с Pfu-полимеразой (Fermentas, Литва) и праймерами RT-SalI-BsiWI-F (5'-tcaggctgactgaacgtacgatgccctattg-3') и RT-BamHI-EcoRI-R (5'-agtagaattcatgtggatccctagagcactttctgattccagc-3').

На основе рКСМV2RT был создан вектор рКСМV2RT-Ii, кодирующий обратную транскриптазу с первыми 30 аминокислотными остатками инвариантной цепи МНС класса II человека на N-конце. Нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент гена инвариантной цепи (NM_001025159.1), получали с использованием синтетических олигонуклеотидов («Синтол», Россия). На первом этапе проводили отжиг олигонуклеотидов IC₁₋₄₅, соответствующего нуклеотидам 1–45 гена инвариантной цепи (5'-atggatgaccagcgcgaccttatctccaacaatgagcaactgccc-3'); 5'-фосфорилированного IC₄₆₋₉₀ – нуклеотиды 46–90 (5'-atgtggggcggcgccctggggcccccggagagcaagtgcagccgc-3'), и IC-mid – нуклеотиды 37–71 комплементарной цепи гена (5'-ggcggccggccagcatggg-cagttgctcattgttg-3') с последующим лигированием одноцепочечного разрыва между IC₁₋₄₅ и IC₄₆₋₉₀. На втором этапе полученный двухцепочечный фрагмент использовали в качестве матрицы для ПЦР. Реакцию проводили с Pfu-полимеразой и прай-

мерами IC-F (5'-atccgtcgacatggatgaccagcgcgacc-3') и IC-R (5'-tgccgctacggcggctgacttgctctc-3'), содержащими сайты рестрикции SalI и BsiWI соответственно. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор рКСМV2RT на 5'-конец гена *RT* по сайтам рестрикции SalI и BsiWI. При этом фрагменты Ii и RT образовали одну рамку считывания. Структуру клонированного фрагмента подтверждали секвенированием района вставки.

Плазмиды, предназначенные для иммунизации животных, выделяли с помощью наборов Plasmid EndoFree (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями фирмы.

Культивирование и трансфекция культуры клеток

Клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и смеси 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Трансфекцию проводили, используя реагент Lipofectamine LTX (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы.

Определение накопления белка в клетках

Содержание обратной транскриптазы в трансфицированных клетках определяли методом иммуноблоттинга. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в буфере RIPA (10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% дезоксихолат натрия, 1% Тритон X-100, 0.1% SDS, 1 мМ EDTA). Образцы клеточных лизатов с равным содержанием белка разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Для блокирования неспецифического связывания мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C в буфере PBS-T (80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 0.1% Твин-20) с добавлением 5% обезжиренного молока. Затем мембраны последовательно инкубировали с поликлональными антителами кролика к RT [20] в разведении 1 : 5000 и специфичными к IgG кролика иммуноглобулинами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1 : 5000. Иммунокомплексы на мембране выявляли с помощью реактивов ECLTM plus (Amersham Pharmacia Biotech., США) и регистрировали сигнал на рентгеновскую пленку (Fuji Film, Япония). Пленку сканировали, изображение обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Затем блоты повторно окрашивали моноклональными антителами мыши к β-актину (Sigma, США) в разведении 1 : 5000 и специфичными к IgG мыши иммуноглобулинами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1 : 5000.

Время полужизни белка в клетке

Анализ проводили на основе методики [21], которую ранее уже использовали для обратной транскриптазы [22]. Через 2 сут после трансфекции к клеткам добавляли циклогексимид (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 0, 2 и 4 ч. Затем клетки лизировали, и образцы с равным содержанием белка разделяли в 10% ПААГ. Содержание обратной транскриптазы оценивали иммуноблотингом.

Значение времени полужизни белка рассчитывали по стандартной формуле полураспада вещества

$$N = N_0 \times 2^{t/T},$$

где N_0 – начальное количество белка, N – количество белка в момент времени t , T – время полужизни белка.

Ингибирование протеасомного и лизосомного протеолиза в культуре клеток

В качестве ингибиторов протеасом использовали MG132 и эпоксомидин (Calbiochem, США) в концентрации 5 и 0.1 мкМ соответственно. Активность протеаз лизосом подавляли с помощью хлорохина (Sigma, США) в концентрации 100 мкМ. Ингибиторы добавляли в клеточную среду через 1 сут после трансфекции. Клетки инкубировали с ингибиторами в течение 18 ч, лизировали и оценивали содержание специфических белков иммуноблотингом.

Иммуноокрашивание клеток

Клетки HeLa растили и трансфицировали на покровных стеклах (20 × 20 мм) в шестилуночных планшетах. На вторые сутки после трансфекции клетки фиксировали смесью ацетон–метанол (1 : 1) в течение 1 ч при –20°C. Фиксированные клетки инкубировали в буфере PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего последовательно инкубировали с растворами поликлональных антител кролика к обратной транскриптазе [20], взятых в разведении 1 : 100, специфичных к IgG кролика иммуноглобулинов свиньи, конъюгированных с TRITC (Dako, Дания), в разведении 1 : 50, и моноклональных антител к белку 1, ассоциированному с лизосомами (LAMP1, CD107a) человека, конъюгированных с FITC, в разведении 1 : 50 (BD Pharmingen, США). Антитела разводили в буфере PBS, содержащем 0.5% Твин-20 и 2% бычий сывороточный альбумин (BSA). После каждой инкубации клетки трехкратно промывали буфером PBS. В заключении ядра клеток окрашивали 150 мМ раствором DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола; Invitrogen, США) в течение 1 мин. Слайды заключали в среду

Vectashield (Vector Laboratories, США) и анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS5 (Leica, Германия).

ДНК-иммунизация мышей

Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c (8 недель; Charles River Laboratories, Sandhofer, Германия). Группы из трех–четырёх мышей иммунизировали плазмидами, кодирующими RT-Ii или RT, или пустым вектором. Каждая мышь получала по две инъекции плазмидной ДНК (10 мкг в 20 мкл PBS). Плазмиды вводили инсулиновыми шприцами внутривожно: слева и справа от позвоночника, у основания хвоста. Затем сразу же проводили электропорацию участков введения плазмид на приборе DermaVax (Celectis, Франция) как описано ранее [23]. Через 6 дней после первой инъекции вводили 50 мкг той же плазмиды в PBS внутримышечно (tibialis anterior). На 28 день у мышей забирали кровь из хвостовой вены, после чего их усыпляли и извлекали селезенки. Эксперимент проводили в двух независимых повторах с соблюдением этических норм работы с животными.

FluoroSpot

Селезенки иммунизированных мышей гомогенизировали по отдельности и выделяли спленоциты [24]. Клетки инкубировали в среде культивирования с антигенами: белком RT (12.5 мкг/мл) [25, 26] или пептидами RT (ITTESIVIWGKTPKF (аминокислотные остатки 375–389) и KEKVYLAWVPAKNGIG (аминокислотные остатки 528–543), 10 мг/мл). В положительном контроле спленоциты стимулировали конканавалином А (ConA) – 5 мкг/мл, в отрицательном контроле клетки находились в среде культивирования. После инкубации в течение 20 ч со специфическими и контрольными антигенами оценивали секрецию цитокинов IFN-γ и IL-2 спленоцитами мышшей. Оценку проводили методом FluoroSpot с использованием набора флуороспот-планшетов и реактивов Dual IFN-γ/IL-2 FluoroSpot (Mabtech, Швеция) по протоколу фирмы. Число клеток, секретирующих цитокины, подсчитывали на флуориметре AID ELISpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Накопление и локализация в клетке обратной транскриптазы со встроенным фрагментом инвариантной цепи МНС класса II

С целью изменения пути процессинга обратной транскриптазы ВИЧ-1 подтипа В методами генной инженерии был создан химерный ген, кодирующий рекомбинантный белок, на N-конце которого нахо-

дился фрагмент инвариантной цепи МНС класса II человека с сигналом транспорта в лизосомы через эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Для этого была получена плазмида рКСМV2RT-Ii, которая содержит ген RT с 5'-концевым фрагментом, кодирующим 30 N-концевых аминокислотных остатков инвариантной

цепи МНС класса II человека. Трансфекция клеток HeLa этой плазмидой приводила к появлению в лизатах белка с молекулярной массой 68–70 кДа (рис. 1, дорожка 3), что соответствует ожидаемой массе химерного белка.

Ранее было показано, что в клетках, трансфицированных плазмидой с геном обратной транскриптазы, синтезируемый белок равномерно распределяется в цитоплазме [27]. С помощью иммуноокрашивания установлено, что в клетках HeLa, трансфицированных плазмидой, кодирующей химерный белок RT-Ii, внутриклеточное распределение этого белка изменилось с равномерного на гранулярное (рис. 2). Известно, что подобная локализация свойственна инвариантной цепи, которая направляется в эндосомно-лизосомный компартмент [28]. В трансфицированных клетках, окрашенных одновременно антителами к RT и к белку, ассоциированному с лизосомами (LAMP1, CD107a), который является маркером лизосомно-эндосомного компартмента, наблюдали практически полное совпадение сигналов. Полученная картина иммуноокрашивания свидетельствует о том, что обратная транскриптаза с сигналом инвариантной цепи направляется в лизосомы клетки.

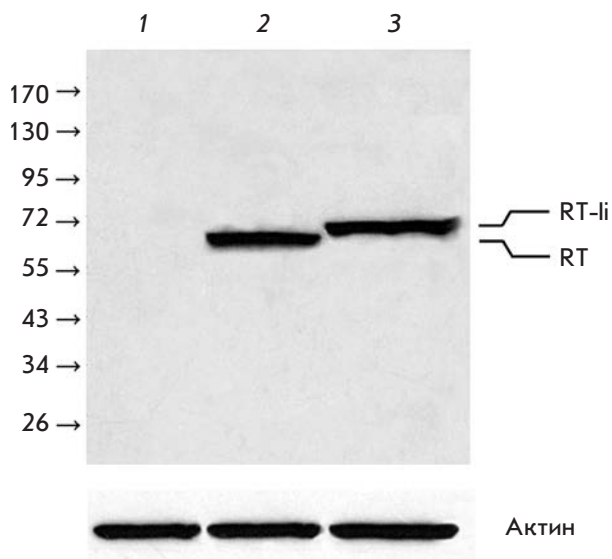


Рис. 1. Накопление белков RT и RT-Ii в клетках HeLa. Иммуноблоттинг лизатов нетрансфицированных клеток (1); клеток, трансфицированных плазмидами рКСМV2RT (2) и рКСМV2RT-Ii (3). Специфическое окрашивание проводили поликлональными антителами к обратной транскриптазе (верхняя панель). Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны повторно инкубировали с антителами к актину (нижняя панель). Слева указано положение белковых маркеров молекулярных масс (кДа)

Встраивание фрагмента инвариантной цепи в RT изменяет ее деградацию

Направление обратной транскриптазы в лизосомы приводит к изменению скорости деградации белка и набора протеаз, осуществляющих ее протеолиз. Ранее мы показали, что время полужизни обратной транскриптазы составляет 18 ч [29, 30]. Анализ скорости деградации химерного белка RT-Ii в трансфицированных клетках после остановки трансляции показал, что время полужизни этого белка сократилось

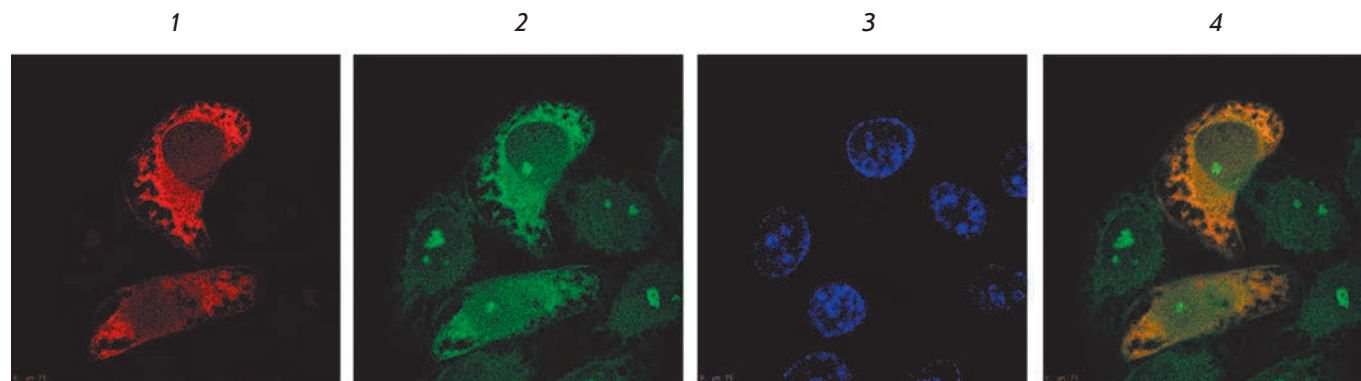


Рис. 2. Внутриклеточная локализация химерного белка RT-Ii. Клетки HeLa трансфицировали плазмидой рКСМV2RT-Ii, фиксировали и окрашивали поликлональными антителами к RT с вторичными TRITC-конъюгированными антителами (1), моноклональными антителами к CD107a человека, конъюгированными с FITC (2) и DAPI (3). Наложение сигналов антител к RT и CD107a (4)

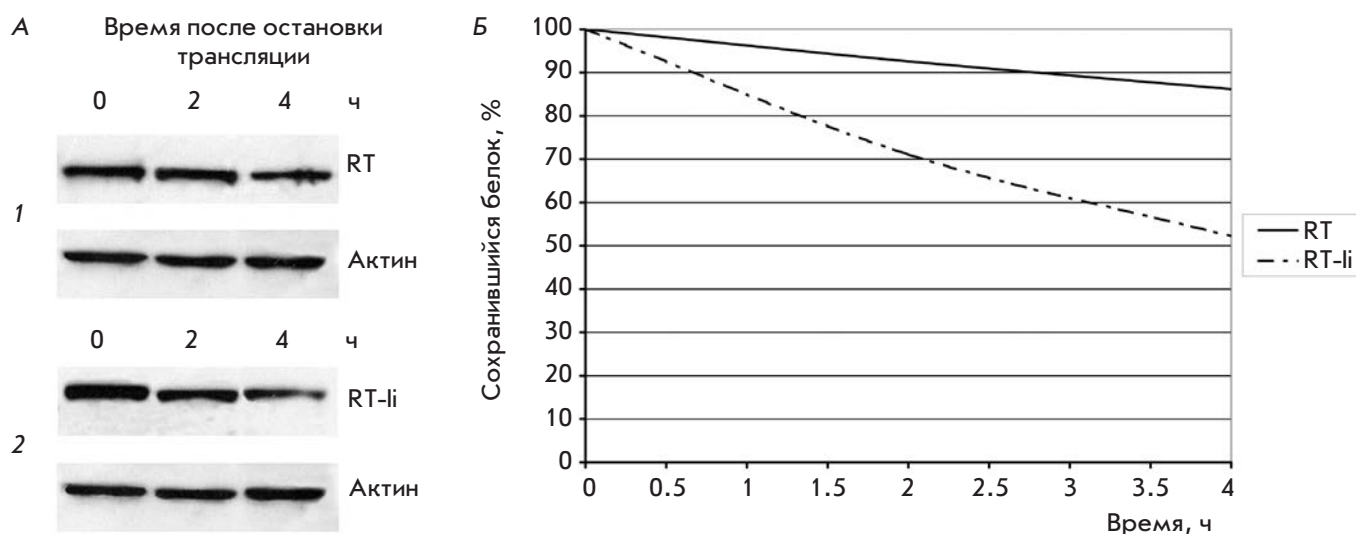


Рис. 3. Динамика деградации RT и RT-Ii в клетках. А – иммуноблотинг клеток HeLa, трансфицированных плазмидами pKCMV2RT (1) и pKCMV2RT-Ii (2) после добавления циклогексимида (100 мкг/мл). Блоты окрашивали поликлональными антителами к обратной транскриптазе. Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны окрашивали антителами к актину. Б – диаграмма, показывающая скорость распада белков

до 4.5 ч (рис. 3). Таким образом, добавление фрагмента Ii к обратной транскриптазе привело к уменьшению времени полужизни белка в 4 раза.

Вклад в процессинг химерного белка RT-Ii протеасомной и лизосомной деградации оценили с применением специфических ингибиторов. Для установления участия протеасомы в деградации химерного белка RT-Ii использовали ингибиторы MG132 и эпоксомидин, а в качестве ингибитора лизосомного протеолиза – хлорохин. Трансфицированные клетки HeLa инкубировали с ингибиторами в течение 18 ч и иммуноблотингом оценивали накопление белка, которое сравнивали с содержанием белка в необработанных ингибиторами клетках (рис. 4). Добавление ингибитора лизосомного протеолиза – хлорохина – не влияло на накопление RT, тогда как под его воздействием количество RT-Ii в клетке увеличивалось в 6 и более раз (рис. 4). RT-Ii, в отличие от RT, оказалась нечувствительной к воздействию ингибиторов протеасомы (рис. 4).

Встраивание сигнала направления в лизосомы повышает иммуногенность RT

Мыши линии BALB/c были праймированы внутрикожной инъекцией плазмиды, кодирующей RT-Ii, с последующей электропорацией, а спустя 5 дней бустированы той же плазмидой, введенной внутримышечно. Контрольных мышей иммунизировали плазмидой, кодирующей немодифицированную RT, или пустым вектором. Иммунный ответ оценивали

по способности спленоцитов мышей вырабатывать IFN- γ и IL-2 после *in vitro*-стимуляции полноразмерным белком RT или пептидами, представляющими ее иммунодоминантные эпитопы (аминокислотные остатки 375–389 и 528–543 [31, 32]). Методом FluoroSpot определяли количество клеток, секретирующих IFN- γ , IL-2 или оба цитокина, в ответ на стимуляцию (рис. 5). Специфическая продукция IFN- γ и IL-2 в ответ на стимуляцию белком и пептидами обнаружена только в группе мышей, иммунизированных плазмидой, кодирующей химерный белок RT-Ii. Большая часть популяции клеток, синтезирующих IFN- γ , также продуцировала и IL-2, т.е. была полифункциональной. В группе мышей, получавших ген RT, а также в контрольной группе, получавшей пустой вектор, специфической секреции цитокинов не наблюдалось (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для формирования эффективного иммунного ответа необходимо участие CD4⁺ Т-клеток. Активация CD4⁺ Т-клеток, стимулирующих как клеточный (Th1-тип CD4⁺ Т-клеток), так и гуморальный иммунитет (Th2-тип), происходит в результате распознавания рецепторами CD4⁺ Т-клеток комплексов антигенных пептидов с молекулами МНС класса II на поверхности антигенпрезентирующих клеток [33]. Основным источником пептидов для связывания с молекулами МНС класса II служат экзогенные белки, которые попадают в клетку путем эндоцитоза,

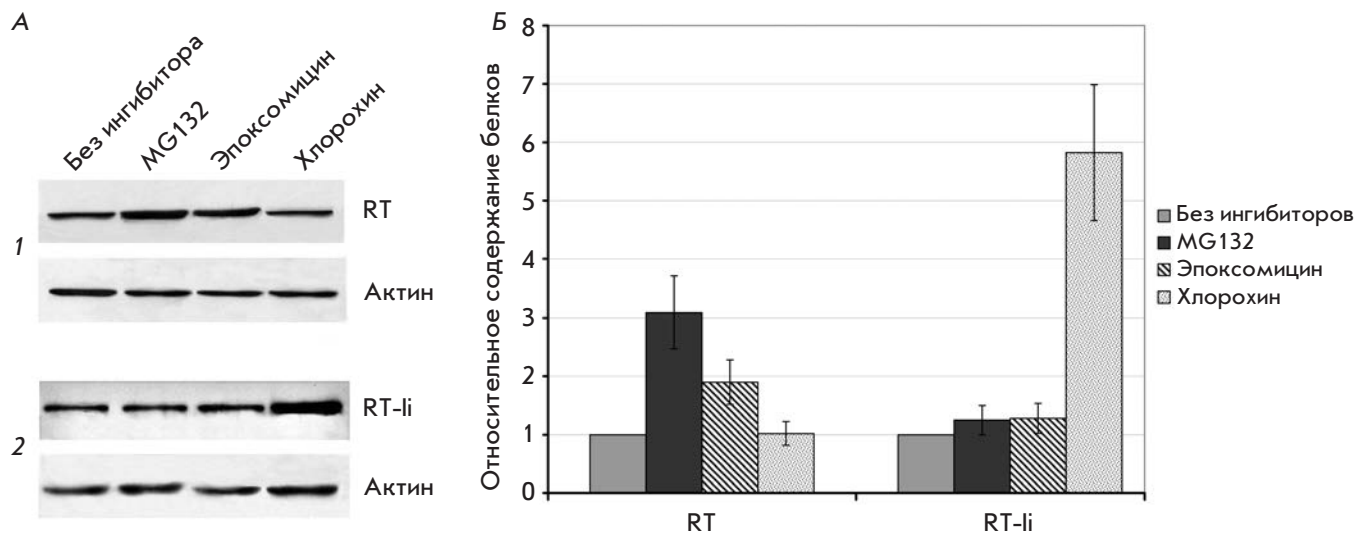


Рис. 4. Накопление RT и RT-li в присутствии ингибиторов протеасомного и лизосомного протеолиза. А – иммуноблотинг клеток HeLa, трансфицированных плазмидами pKCMV2RT (1) и pKCMV2RT-li (2), без добавления ингибиторов или после инкубации в течение 18 ч с MG132 (5 мкМ), эпоксомидином (0.1 мкМ), хлорохином (100 мкМ). Блоты окрашивали поликлональными антителами к RT. Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны окрашивали антителами к актину. Б – диаграмма содержания белков в образцах, обработанных ингибиторами, относительно содержания белка в образце без ингибитора

а затем направляются в лизосомы [34]. Однако в некоторых случаях в комплексе с молекулами МНС класса II могут быть представлены и пептиды из состава белков, синтезируемых внутри клетки. Эти белки ассоциированы с лизосомами, где и происходит их процессинг [35, 36]. В связи с этим было предложено встроить в антиген природный сигнал лизосомной локализации и тем самым направить его в лизосому для процессинга и презентации в комплексе с молекулами МНС класса II [7].

Ранее для искусственного направления антигенов на презентацию в МНС класса II использовали сигналы белков LAMP1 [37] и AP3-связывающего мотива LIMP-II [38]. Испытание иммуногенности таких химерных ДНК-вакцин на лабораторных животных показало, что они способны индуцировать более сильный иммунный ответ, чем исходные варианты антигенов [24, 39, 40]. Наблюдалась как стимуляция образования В-лимфоцитами защитных антител, так и увеличение активности цитотоксических лимфоцитов. В большинстве случаев иммунный ответ на химерную конструкцию был более продолжительным, чем на немодифицированный антиген [7].

Путем присоединения инвариантной цепи к рекомбинантным антигенам удалось добиться усиления иммуногенности и увеличения у иммунизированных животных длительности протективного иммунного ответа на ДНК-вакцинные препараты.

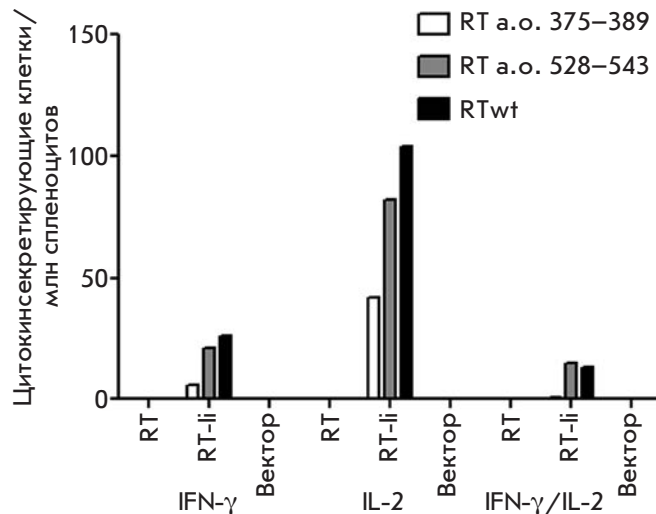


Рис. 5. Иммунный ответ животных, иммунизированных плазмидами, кодирующими RT и RT-li. Мышей иммунизировали плазмидами pKCMV2RT, pKCMV2RT-li или пустым вектором, выделяли спленоциты, стимулировали их обратной транскриптазой (RTwt) или пептидами RT (RT 375–389 или RT 528–543), затем методом FluoroSpot определяли число спленоцитов, секретирующих IFN-γ и IL-2 (число точкоформирующих клеток на миллион спленоцитов)

ДНК-конструкции, кодирующие белок, состоящий из гликопротеида вируса лимфоцитарного хориоменингита и Ii, обладали повышенной способностью к активации CD4+ и CD8+ Т-клеток [12]. Однократное вакцинирование мышей химерным геном защищало животных от заражения летальной дозой вируса [12]. Эффективность этого подхода наблюдали и при ДНК-иммунизации крупных животных. Так, была создана ДНК-вакцина, кодирующая гибридный основной поверхностный белок *Anaplasma marginale* с фрагментом инвариантной цепи крупного рогатого скота [13]. Однократное введение такой ДНК-вакцины телятам стимулировало выработку иммуноглобулинов класса G к анаплазме и приводило к активной пролиферации CD4+ Т-клеток, сопровождающейся антигенспецифичной секрецией IFN- γ . Такая ДНК-иммунизация была достаточной для образования иммунологической памяти, обеспечивающей ускоренный ответ при повторной встрече с антигеном [13].

В нашей работе создана ДНК-конструкция, кодирующая обратную транскриптазу ВИЧ-1 подтипа В, на N-конце которой был встроен фрагмент инвариантной цепи МНС класса II человека, несущий сигнал лизосомной локализации. Химерный белок накапливался в везикулярных структурах клетки, таких, как ЭПР, аппарат Гольджи и эндосомно-лизосомный компартмент. Добавление фрагмента Ii к RT привело к существенному (в 4 раза) уменьшению времени полужизни химерного белка по сравнению с немодифицированной обратной транскриптазой. Ингибиторы протеасомы не влияли на накопление в клетках белка RT-Ii. В то же время при обработке клеток ингибитором лизосомного протеолиза содержание химерного белка в клетках многократно увеличивалось. Таким образом, встраивание в обратную транскриптазу фрагмента инвариантной цепи человека с сигналом лизосомной локализации привело к изменению пути ее деградации с протеасомного на лизосомный.

ДНК-иммунизация мышей плазмидой, несущей химерный ген, показала, что он способен вызывать антигенспецифичную продукцию IFN- γ и IL-2, в то время как исходный ген специфического иммунного ответа не вызывал. Таким образом, путем добав-

ления минимального фрагмента инвариантной цепи с сигналом направления в лизосому удалось преодолеть низкую иммуногенность гена обратной транскриптазы в составе плазмидной ДНК.

Следует отметить, что большая часть спленоцитов иммунизированных животных секретировала как IFN- γ , так и IL-2. Продукция IFN- γ считается важным показателем, свидетельствующим о формировании эффективной защиты от вирусной инфекции. IL-2 важен для экспансии Т-клеток памяти, которые составляют основу долговременного протективного иммунитета [41]. Большинство эпитоп-специфичных цитотоксических лимфоцитов продуцируют IFN- γ ; гораздо меньшая доля клеток, называемых «полифункциональными», способна к секреции нескольких цитокинов: IFN- γ , IL-2 и TNF- α [42]. Такие клетки необходимы как для эффективного контроля инфекционного процесса, так и для формирования протективного ответа при вакцинации [43, 44]. Используемый в настоящей работе способ конструирования ДНК-вакцин обеспечивает выработку полифункционального иммунного ответа, позволяя получить такой ответ, в том числе и на слабые иммуногены.

ВЫВОДЫ

Таким образом, за счет добавления последовательности, несущей сигнал направления в лизосомы инвариантной цепи человека, улучшена конструкция ДНК-вакцины на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1. Введение сигнала направления в лизосомы привело к изменению локализации обратной транскриптазы и пути ее деградации. Эта модификация позволила преодолеть низкую иммуногенность обратной транскриптазы как ДНК-иммуногена, приведя к выработке у мышей выраженного антигенспецифичного иммунного ответа. Улучшенную конструкцию на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1 можно включать в состав мультигенных ДНК-вакцинных препаратов с целью повышения их эффективности. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 11-04-01569-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 927–974.
- Chan K., Lee D.J., Schubert A., Tang C.M., Crain B., Schoenberger S.P., Corr M. // J. Immunol. 2001. V. 166. P. 3061–3066.
- Maecker H.T., Umetsu D.T., DeKruyff R.H., Levy S. // J. Immunol. 1998. V. 161. P. 6532–6536.
- Almeida R.R., Rosa D.S., Ribeiro S.P., Santana V.C., Kallas E.G., Sidney J., Sette A., Kalil J., Cunha-Neto E. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e45267.
- Hutnick N.A., Myles D.J., Bian C.B., Muthumani K., Weiner D.B. // Curr. Opin. Virol. 2011. V. 1. P. 233–240.
- Neefjes J., Jongsma M.L., Paul P., Bakke O. // Nat. Rev. Immunol. 2011. V. 11. P. 823–836.
- Starodubova E.S., Isaguliantz M.G., Karpov V.L. // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 1 (4), P. 53–60.
- Bremnes B., Madsen T., Gedde-Dahl M., Bakke O. // J. Cell Sci. 1994. V. 107. P. 2021–2032.
- Odorizzi C.G., Trowbridge I.S., Xue L., Hopkins C.R., Davis C.D., Collawn J.F. // J. Cell Biol. 1994. V. 126. P. 317–330.

10. Pieters J., Bakke O., Dobberstein B. // *J. Cell Sci.* 1993. V. 106. Pt 3. P. 831–846.
11. Diebold S.S., Cotten M., Koch N., Zenke M. // *Gene Ther.* 2001. V. 8. P. 487–493.
12. Holst P.J., Sorensen M.R., Mandrup Jensen C.M., Orskov C., Thomsen A.R., Christensen J.P. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 3339–3346.
13. Mwangi W., Brown W.C., Splitter G.A., Davies C.J., Howard C.J., Hope J.C., Aida Y., Zhuang Y., Hunter B.J., Palmer G.H. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 304–311.
14. Rowe H.M., Lopes L., Ikeda Y., Bailey R., Barde I., Zenke M., Chain B.M., Collins M.K. // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 310–319.
15. Sponaas A., Carstens C., Koch N. // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 1826–1834.
16. Brave A., Hallengard D., Malm M., Blazevic V., Rollman E., Stanescu I., Krohn K. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 184–186.
17. Sandstrom E., Nilsson C., Hejdeman B., Brave A., Bratt G., Robb M., Cox J., Vancott T., Marovich M., Stout R., et al. // *J. Infect. Dis.* 2008. V. 198. P. 1482–1490.
18. Isagulians M.G., Petrakova N.N., Zuber B., Pokrovskaya K., Gizatullin R., Kostyuk D.A., Kjerrstrom A., Winberg G., Kochetkov S.N., Hinkula J., et al. // *Intervirol.* 2000. V. 43. P. 288–293.
19. Isagulians M.G., Pokrovskaya K., Kashuba V.I., Pokholok D., Hinkula J., Wahren B., Kochetkov S.N. // *FEBS Lett.* 1999. V. 447. P. 232–236.
20. Isagulians M.G., Gudima S.O., Ivanova O.V., Levi M., Hinkula J., Garaev M.M., Kochetkov S.N., Wahren B. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000. V. 16. P. 1269–1280.
21. Zhou P. // *Methods Mol. Biol.* 2004. V. 284. P. 67–77.
22. Стародубова Е.С., Исагулянц М.Г., Карпов В.И. // *Мол. биол.* 2006. Т. 40. P. 983–989.
23. Roos A.K., Eriksson F., Walters D.C., Pisa P., King A.D. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. P. 1637–1642.
24. Starodubova E., Boberg A., Ivanov A., Latyshev O., Petrakova N., Kuzmenko Y., Litvina M., Chernousov A., Kochetkov S., Karpov V., et al. // *Vaccine.* 2010. V. 28. P. 1975–1986.
25. Rechinskii V.O., Barbashov S.F., Degtiarev I.L., Vorob'ev S.M., Liakhov D.L., Kostyuk D.A., Starov A.I., Matsevich G.R., Kochetkov S.N. // *Mol. Biol. (Mosk.)* 1991. V. 25. P. 1248–1257.
26. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48. P. 14–23.
27. Starodubova E.S., Boberg A., Litvina M., Morozov A., Petrakova N.V., Timofeev A., Latyshev O., Tunitskaya V., Wahren B., Isagulians M.G., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 28. P. 1975–1986.
28. Lamb C.A., Yewdell J.W., Bennink J.R., Cresswell P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 5998–6002.
29. Isagulians M.G., Belikov S.V., Starodubova E.S., Gizatullin R.Z., Rollman E., Zuber B., Zuber A.K., Grishchenko O.I., Rytting A.S., Kallander C.F., et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2004. V. 20. P. 191–201.
30. Starodubova E., Boberg A., Kashuba E.V., Wahren B., Karpov V., Isagulians M. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 4541–4547.
31. Borg J.P., Ihlenfeldt H.G., Jung G., Haas G., Pierres M. // *Eur. J. Immunol.* 1994. V. 24. P. 1496–1502.
32. Restle T., Pawlita M., Sczakiel G., Muller B., Goody R.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 14654–14661.
33. Prlic M., Williams M.A., Bevan M.J. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 315–319.
34. Watts C. // *Annu. Rev. Immunol.* 1997. V. 15. P. 821–850.
35. Robinson J.H., Delvig A.A. // *Immunology.* 2002. V. 105. P. 252–262.
36. van Bergen J., Ossendorp F., Jordens R., Mommaas A.M., Drijfhout J.W., Koning F. // *Immunol. Rev.* 1999. V. 172. P. 87–96.
37. Wu T.C., Guarneri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Viscidi R.P., Levitsky H.I., Hedrick L., Cho K.R., August J.T., Pardoll D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 11671–11675.
38. Gupta S.N., Kloster M.M., Rodionov D.G., Bakke O. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. V. 85. P. 457–467.
39. Goldoni A.L., Maciel M., Jr., Rigato P.O., Piubelli O., de Brito C.A., Melo A., Marques E.T., August J.T., Duarte A.J., Sato M.N. // *Immunobiology.* 2011. V. 216. P. 505–512.
40. Valentin A., Chikhlikar P., Patel V., Rosati M., Maciel M., Chang K.H., Silvera P., Felber B.K., Pavlakakis G.N., August J.T., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 4840–4849.
41. Williams M.A., Tyznik A.J., Bevan M.J. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 890–893.
42. Belz G.T., Xie W., Doherty P.C. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 4627–4633.
43. Darragh P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W., Davey D.F., Flynn B.J., Hoff S.T., Andersen P., Reed S.G., Morris S.L., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. P. 843–850.
44. Forbes E.K., Sander C., Ronan E.O., McShane H., Hill A.V., Beverley P.C., Tchilian E.Z. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 4955–4964.

УДК 576.32/.36

Роль дигидрооротатдегидрогеназы в индукции апоптоза при ингибировании III комплекса дыхательной цепи митохондрий

А. А. Хуторненко¹, А. А. Далина³, Б. В. Черняк¹, П. М. Чумаков³, А. Г. Евстафьева^{1,2*}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

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

Поступила в редакцию 12.08.2013

РЕФЕРАТ Изучен механизм включения программируемой клеточной смерти (апоптоза) при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий. Ранее мы обнаружили, что ингибирование митохондриального цитохрома *bc1* (комплекса III дыхательной цепи) приводит к повышению уровня и активности опухолевого супрессора p53 и индукции апоптоза. С дыхательной цепью сопряжен путь биосинтеза пиримидинов *de novo* через митохондриальную дигидрооротатдегидрогеназу (ДГОДГ). Нами показано, что причиной активации p53 при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий служит нарушение работы ДГОДГ и биосинтеза пиримидинов *de novo*. Однако является ли подавление функционирования ДГОДГ основной причиной включения апоптотической программы клетки при ингибировании комплекса III дыхательной цепи, оставалось не выясненным. В настоящей работе установлено, что апоптотическую гибель клеток рака толстого кишечника человека при действии миксотиазола – ингибитора комплекса III дыхательной цепи митохондрий – предотвращают уридин и оротат (продукт реакции, катализируемой ДГОДГ), но не дигидрооротат (субстрат ДГОДГ). Следовательно, индукция апоптоза при нарушении работы комплекса III обусловлена ингибированием ДГОДГ и, как следствие, биосинтеза пиримидинов *de novo*. Этот вывод подтвержден результатами опытов по подавлению экспрессии ДГОДГ с помощью РНК-интерференции. Оказалось, что нокдаун ДГОДГ приводит к аккумуляции опухолевого супрессора p53 и способствует программируемой клеточной смерти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, биосинтез пиримидинов *de novo*, дигидрооротатдегидрогеназа, дыхательная цепь митохондрий, опухолевый супрессор p53.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДГОДГ – дигидрооротатдегидрогеназа; ДЦМ – дыхательная цепь митохондрий; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; shRNA – малые шпилечные РНК; PrI – йодид пропидия; FITC – флуоресцеинизотиоцианат.

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии играют центральную роль в гомеостазе эукариотической клетки. Они не только снабжают клетку энергией за счет окислительного фосфорилирования, но и служат важными медиаторами программируемой клеточной смерти, а также внутриклеточных сигнальных каскадов, опосредуемых ионами кальция и активными формами кислорода [1]. Дыхательная цепь митохондрий (ДЦМ) состоит из интегрированных во внутреннюю митохондриальную мембрану мультикомпонентных белковых комплек-

сов I–IV, которые катализируют перенос электронов от NADH на молекулярный кислород. Это приводит к образованию электрохимического протонного градиента на внутренней мембране митохондрий, который является движущей силой синтеза АТФ с помощью АТФ-синтазы (комплекс V).

Установлено, что многие заболевания человека связаны с нарушениями функций митохондрий, причем так называемые «митохондриальные болезни» обусловлены, как правило, дефектами дыхательной цепи этих органелл [2]. Отклонения в работе мито-

хондрией вовлечены в процесс старения [3]. С возрастом в митохондриальной ДНК млекопитающих увеличивается число мутаций и наблюдается нарушение функций дыхательной цепи. Клетки с дефектами в ДЦМ склонны к апоптозу, и усиленная потеря клеток является важным следствием митохондриальной дисфункции. В данной работе мы обратились к механизму включения апоптотической программы при нарушении функционирования ДЦМ.

Опухолевый супрессор p53 – это ключевой регуляторный белок, от которого во многих случаях зависит поведение клетки при разных видах стресса: произойдет ли арест клеточного цикла, сопровождающийся репарацией повреждений, или включатся механизмы программируемой клеточной смерти, направленные на удаление клеток с нерепарируемыми повреждениями [4]. Ранее мы обнаружили, что ингибирование комплекса III ДЦМ приводит к повышению уровня p53 и его активности, к включению программируемой смерти раковых клеток человека [5]. Оказалось, что к активации p53 приводит не ингибирование ДЦМ само по себе, а нарушение функционирования именно комплекса III (комплекс цитохрома bc1), который переносит электроны от восстановленного убихинона (убихинола) на цитохром c. С ДЦМ сопряжен один из важнейших метаболических путей в клетке – биосинтез пиримидинов *de novo* [6]. Единственный митохондриальный фермент этого пути – это дигидрооротатдегидрогеназа (ДГОДГ), окисляющая дигидрооротат до оротата и использующая убихинон в качестве акцептора электронов [6]. Нарушение работы комплекса III ДЦМ приводит к переходу убихинона в восстановленное состояние, что, в свою очередь, может ингибировать работу ДГОДГ и вести к нарушению биосинтеза пиримидинов. Нам действительно удалось показать, что возрастание уровня и активности p53 при ингибировании комплекса III ДЦМ обусловлено нарушением работы ДГОДГ и биосинтеза пиримидинов *de novo* [5]. Однако служит ли подавление функционирования ДГОДГ основной причиной включения апоптотической программы клетки при ингибировании комплекса III ДЦМ, оставалось не выясненным.

В настоящей работе показано, что нарушение работы ДГОДГ и, как следствие, биосинтеза пиримидинов *de novo* служит причиной индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека при ингибировании комплекса III ДЦМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия выращивания и обработки клеток

Клетки RKO и HCT116 рака толстого кишечника человека выращивали на среде DMEM, содержащей

10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), при 37°C и 5% CO₂ до состояния 50–70% конfluence. После этого клетки инкубировали в течение 12 ч для определения уровня p53 и в течение 20–26 ч для анализа апоптоза в присутствии 200 нМ миксотриазола (Sigma-Aldrich Inc.). В некоторых опытах в среду добавляли уридин до конечной концентрации 50 мкг/мл, оротат или дигидрооротат (Sigma-Aldrich Inc.) до конечной концентрации 1 мМ.

Оценка апоптоза методом проточной цитофлуориметрии

Клетки снимали с подложки трипсинолизом, промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, 0.14 М NaCl; 2.7 мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 1.8 мМ KH₂PO₄, pH 7.3) и суспендировали в 100 мкл аннексинового буфера (10 мМ HEPES; 140 мМ NaCl; 2.5 мМ CaCl₂, pH 7.4). Затем к клеткам добавляли 7.5 мкл аннексина V, конъюгированного с FITC (Invitrogen), и йодид пропидия (Clontech) до конечной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали в течение 15 мин в темноте. После этого добавляли еще 500 мкл аннексинового буфера, суспензию клеток фильтровали через фильтр с диаметром пор 30 мкм и анализировали с помощью проточного цитометра Partec PASIII.

Иммуноблоттинг

Клетки лизировали в буфере RLB (Promega Inc.). Одинаковые количества белковых экстрактов (50–100 мкг) фракционировали электрофорезом в 12% ДСН-ПААГ, затем осуществляли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и обработку мембраны как описано ранее [7]. Мембрану инкубировали с моноклональными мышинными антителами к ДГОДГ (ab54621, Abcam), к p53 (DO-1) или актину (C-2) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), разведенными в соотношении 1 : 500 буфером TBST (20 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 140 мМ NaCl; 0.05% Твин-20) в течение 2 ч. С целью контроля нагрузки мембраны инкубировали с антителами к актину. Детекцию проводили с помощью вторичных антимышиных антител овцы, конъюгированных с пероксидазой хрена (GE Healthcare), и усиленной хемилюминесценции по стандартной методике (Western Lightning Chemiluminescence Reagent, Perkin Elmer Life Sciences).

Получение клеточных линий с пониженным уровнем ДГОДГ

Лентивирусные векторы на основе плазмиды pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich Inc.) содержали гены коротких шпилечных РНК к ДГОДГ со следующими последовательностями: si21 – CCGGTC-CGGGATTTTATCAACTCAAACCTCGAGTTTGA GTT-GATAAATCCCGGATTTTTT, si32 – CCGGCGGACTT-

TATAAGATGGGCTTCTCGA GAAGCCCATCT-TATAAAGTCCG TTTTT.

Для каждого из лентивирусных векторов, pLKO-si21 и pLKO-si32, были получены вирусные стоки. Для этого клетки эмбриональной почки человека HEK293T на 10-см чашках Петри трансфицировали соответствующим лентивирусным вектором и набором упаковочных плазмид [8] с помощью реагента LipofectAMIN 2000 (Invitrogen) по методике производителя. Использовали смесь четырех плазмид: 3 мкг лентивирусного вектора, 12 мкг плазмиды pRev2, экспрессирующей белок Rev, 6 мкг плазмиды pGag1, экспрессирующей белки Pol и Gag, и 3 мкг плазмиды pVSV-G, экспрессирующей гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (всего 24 мкг ДНК). Разведенную средой DMEM смесь плазмид смешивали с разведенным реагентом LipofectAMIN 2000 (60 мкл), интенсивно перемешивали, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и раскапывали на чашку с клетками. На следующий день среду заменяли на 10 мл DMEM, содержащей 2% телячьей эмбриональной сыворотки.

Спустя 2 дня после трансфекции собирали секретуемые вирусные частицы: 10 мл среды от трансфицированных клеток фильтровали через фильтр с низкой сорбцией белков (Durapore membrane, Millex-NV, Millipore) с порами 0.45 мкм, и аликвоты объемом 1 мл хранили при -70°C .

Клетки RKO инфицировали вирусными частицами, несущими два разных варианта гена короткой шпилечной РНК к ДГОДГ (si32 и si21), а также контрольными вирусами, не содержащими короткой шпилечной РНК (pLS-Lpw). Для этого к клеткам, росшим на 35-мм чашках, добавляли 1 мл вирусных частиц, разбавленных 1 мл свежей среды, и 5–8 мкг полибрана (Hexadimethrine bromide, Sigma-Aldrich Inc.). Клетки растили в присутствии уридина (50 мкг/мл). Спустя 3 дня добавляли пурамицин (1 мкг/мл) и вели селекцию в течение еще 3 дней. Затем клетки лизировали, и определяли уровень ДГОДГ с помощью иммуноблоттинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Роль нарушения биосинтеза пиримидинов в индукции апоптоза при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий

Нами показано, что действие ингибиторов комплекса III ДЦМ приводит к остановке роста ряда линий клеток эпителиальных опухолей и их массовой гибели. Цитометрический анализ окрашенных FITC-аннексином V и йодидом пропидия (PrI) клеток RKO рака толстого кишечника человека, обработанных миксотиазолом, ингибитором ком-

плекса III ДЦМ, выявил значительную популяцию апоптотических клеток (рис. 1). В целом наблюдали три популяции клеток: нормальные клетки (аннексин V-отрицательные, PrI-отрицательные); апоптотические клетки (аннексин V-положительные, PrI-отрицательные, примерно 20% от всех клеток) и третья, небольшая популяция мертвых клеток (аннексин V-положительные, PrI-положительные, доля которых составляла примерно 3%). Размер последней популяции был больше, когда клетки собирали не только с подложки, но и из среды (данные не приведены), и эти клетки рассматривали как некротические или позднеапоптотические.

Поскольку с дыхательной цепью митохондрий функционально связан путь биосинтеза пиримидинов *de novo* через встроенную в митохондриальную мембрану дигидрооротатдегидрогеназу [6], мы решили проверить как влияет восполнение пула пиримидинов на апоптоз, вызываемый миксотиазолом. С этой целью после обработки клеток RKO миксотиазолом в присутствии уридина проводили цитометрический анализ. Оказалось, что уридин, предшественник как уридиловых, так и цитидиловых нуклеотидов, практически полностью предотвращает накопление апоптотических аннексин V-положительных, PrI-отрицательных клеток, вызванное обработкой миксотиазолом (рис. 1). Это указывает на то, что причиной индукции апоптоза служит нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo*, предположительно за счет ингибирования ДГОДГ.

Чтобы прямо оценить роль ДГОДГ, клетки RKO обрабатывали миксотиазолом в присутствии субстрата или продукта катализируемой ДГОДГ реакции, и анализировали уровень апоптоза методом проточной цитометрии. Оказалось, что дигидрооротат (субстрат ДГОДГ) не влияет на индуцированный миксотиазолом апоптоз (рис. 1), а оротат (продукт реакции, катализируемой ДГОДГ) его в значительной степени предотвращает (количество апоптотических клеток в 4 раза ниже, чем при индукции апоптоза под действием миксотиазола, рис. 1).

Аналогичные результаты получены и для другой линии клеток рака толстого кишечника человека, HCT116 (не показано).

Полученные данные свидетельствуют о том, что индукция апоптоза при ингибировании комплекса III ДЦМ в существенной степени обусловлена ингибированием ДГОДГ и нарушением биосинтеза пиримидинов *de novo*. Для более полной уверенности в этом молекулярном механизме было решено провести обратный эксперимент и проверить, действительно ли нарушение работы ДГОДГ вызывает апоптотическую гибель клеток подобно ингибированию комплекса III ДЦМ.

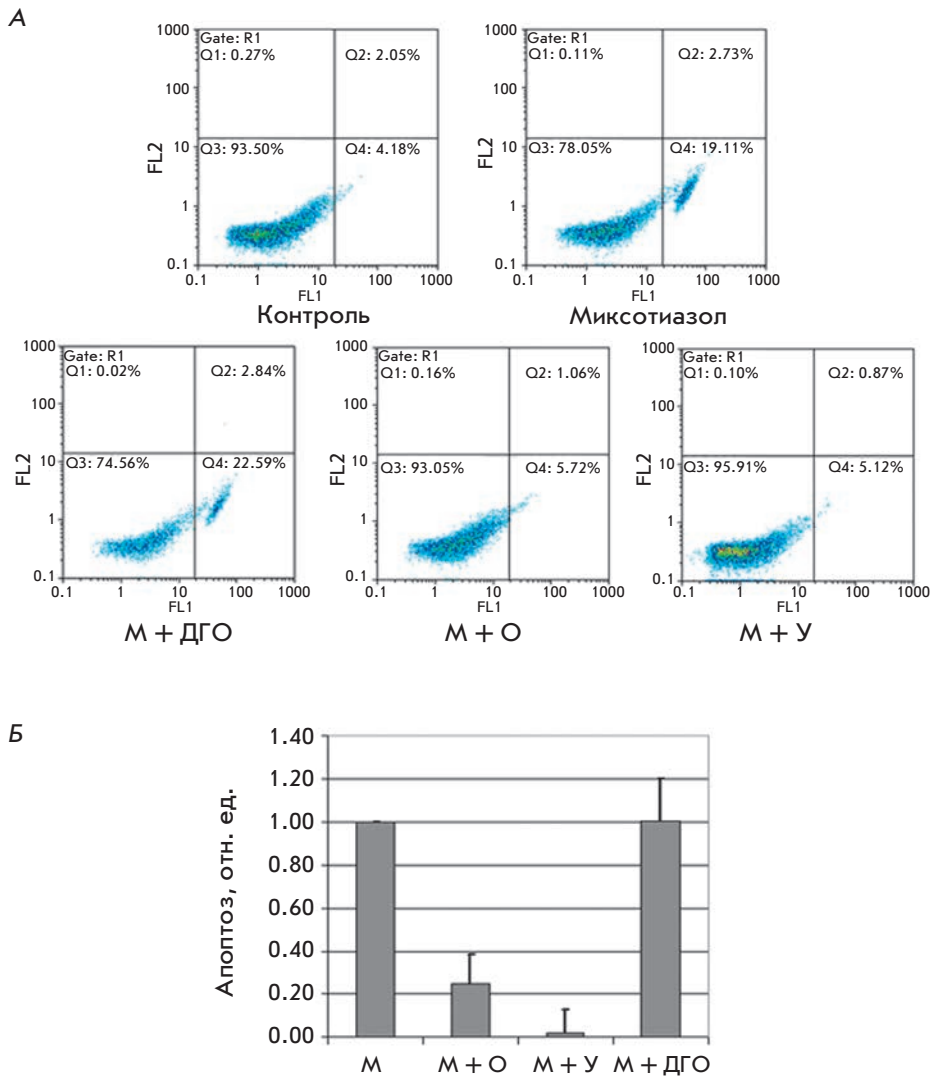


Рис. 1. Уридин и оротат, но не дигидрооротат, защищают клетки РКО от вызываемого миксотиазолом апоптоза. Уровень апоптоза клеток РКО, окрашенных FITC-аннексином V и PriI, определен методом проточной цитофлуориметрии. А – репрезентативная 2D-диаграмма распределения клеток по интенсивности флуоресценции в каналах FL2 (PriI) и FL1 (FITC-аннексин V). Клетки анализировали спустя 26 ч после обработки 200 нМ миксотиазола отдельно (Миксотиазол, М) или совместно с 1 мМ дигидрооротата (М + ДГО), 1 мМ оротата (М + О), 1 мМ уридина (М + У). Контроль – необработанные клетки. Б – статистическая обработка результатов. Процент апоптотических (аннексин V-положительных, PriI-отрицательных) клеток в каждом образце после вычитания контрольных значений был нормирован на процент клеток, в которых апоптоз был индуцирован миксотиазолом без добавок. На диаграмме приведены средние значения относительного уровня апоптоза и SD на основании трех независимых опытов

Влияние нокдауна дигидрооротатдегидрогеназы на опухолевый супрессор p53 и программируемую клеточную смерть

Действительно ли нарушение работы ДГОДГ вызывает апоптотическую гибель клеток подобно ингибированию комплекса III ДЦМ? Чтобы выяснить это, решено было получить линию клеток РКО, в которой экспрессия ДГОДГ подавлена с помощью РНК-интерференции. Для эффективной доставки кассеты, экспрессирующей короткие интерферирующие РНК, использовали лентивирусную систему. Клетки РКО инфицировали лентивирусными частицами, несущими два разных варианта гена короткой шпилечной РНК к ДГОДГ (si32 и si21), а также контрольными вирусами, не содержащими эти гены (pLS-Lpw), и растили в присутствии уридина. Клетки с интегрированными в хромосому экспрессионными кассета-

ми отбирали с помощью пуromицина, лизировали и определяли уровень ДГОДГ с помощью иммуноблотинга (рис. 2).

Таким образом, было выяснено, что в клетках, экспрессирующих две разных коротких шпилечных РНК к ДГОДГ, уровень ДГОДГ значительно ниже, чем в клетках, инфицированных вирусными частицами на основе «пустого» вектора (рис. 2).

Ранее мы показали, что при ингибировании комплекса III ДЦМ происходит активация опухолевого супрессора p53 за счет нарушения работы ДГОДГ [5]. Чтобы проверить, вызывает ли нокдаун ДГОДГ аккумуляцию p53, методом иммуноблотинга сравнили уровень p53 в контрольных клетках и в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина. Оказалось, что в клетках с нокдауном ДГОДГ

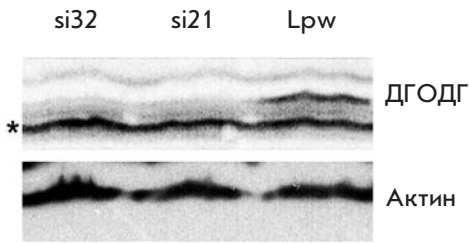


Рис. 2. Оценка эффективности РНК-интерференции ДГОДГ. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si21 (si21), или pLKO-si32 (si32), или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Верхняя панель – с антителами к ДГОДГ, нижняя панель – с антителами к β-актину, используемыми в качестве контроля нанесения. Звездочкой (*) отмечена неспецифическая полоса, которая также может служить контролем нанесения образцов



Рис. 3. Интерференция ДГОДГ в клетках RKO приводит к индукции p53 аналогично действию миксотиазола, ингибитора комплекса III ДЦМ. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si21 (si21), pLKO-si32 (si32) или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Клетки культивировали в отсутствие уридина в течение 24 ч. Справа для сравнения приведен иммуноблот лизатов клеток RKO, не обработанных (К) или обработанных 200 нМ миксотиазолом (М) в течение 12 ч. Верхняя панель – с антителами к p53, нижняя панель – с антителами к β-актину

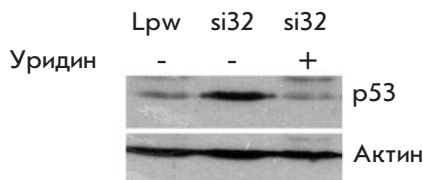


Рис. 4. Уридин предотвращает индукцию p53 в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si32 (si32) или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Клетки культивировали в отсутствие (-) или в присутствии (+) уридина в течение 24 ч. Верхняя панель – с антителами к p53, нижняя – с антителами к β-актину

уровень p53 возрастает так же, как при ингибировании комплекса III ДЦМ (рис. 3).

Добавление уридина предотвращало накопление p53 в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК (рис. 4). Следовательно, наиболее вероятной причиной повышения уровня p53 в этих клетках можно считать нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo*.

Далее проводили цитометрический анализ окрашенных FITC-аннексином V и йодидом пропидия клеток со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина. Оказалось, что функциональным следствием подавления экспрессии ДГОДГ и стабилизации p53 является возрастание доли апоптотических аннексин V-положительных, PrI-отрицательных клеток (рис. 5). Добавление в ростовую среду уридина снижало процент апоптотических клеток до контрольного уровня, что свидетельствует о специфичности наблюдаемого эффекта.

Таким образом, с помощью подавления экспрессии ДГОДГ методом РНК-интерференции показано, что как нарушение работы ДГОДГ, так и ингибирование комплекса III ДЦМ приводят к повышению внутриклеточного уровня опухолевого супрессора p53 и возрастанию уровня программируемой клеточной смерти – апоптоза. Эти результаты подтверждают нашу модель, в соответствии с которой индукция апоптоза при ингибировании комплекса III ДЦМ, так же как и стабилизация и активация p53, происходят за счет ингибирования ДГОДГ и нарушения биосинтеза пиримидинов *de novo*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митохондрии – это «энергетические станции» клетки, являющиеся одновременно медиаторами ряда регуляторных путей, включая индукцию апоптоза [1]. Ранее мы показали, что ингибирование комплекса III ДЦМ приводит к активации опухолевого супрессора p53 и включению программы клеточной смерти [5]. Оказалось, что к активации p53 приводит не само ингибирование цепи переноса электронов, а нарушение функционирования именно комплекса цитохрома bc1. Было показано, что это происходит вследствие ингибирования дигидрооротатдегидрогеназы, единственного митохондриального фермента пути биосинтеза пиримидинов *de novo*. Однако оставалось не известным, служит ли ингибирование ДГОДГ единственной причиной включения программируемой клеточной смерти при ингибировании комплекса III ДЦМ.

ДГОДГ – это флавопротеин, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий. ДГОДГ окисляет дигидрооротат до оротата и использует убихинон в качестве акцептора электронов [6]. В настоящей ра-

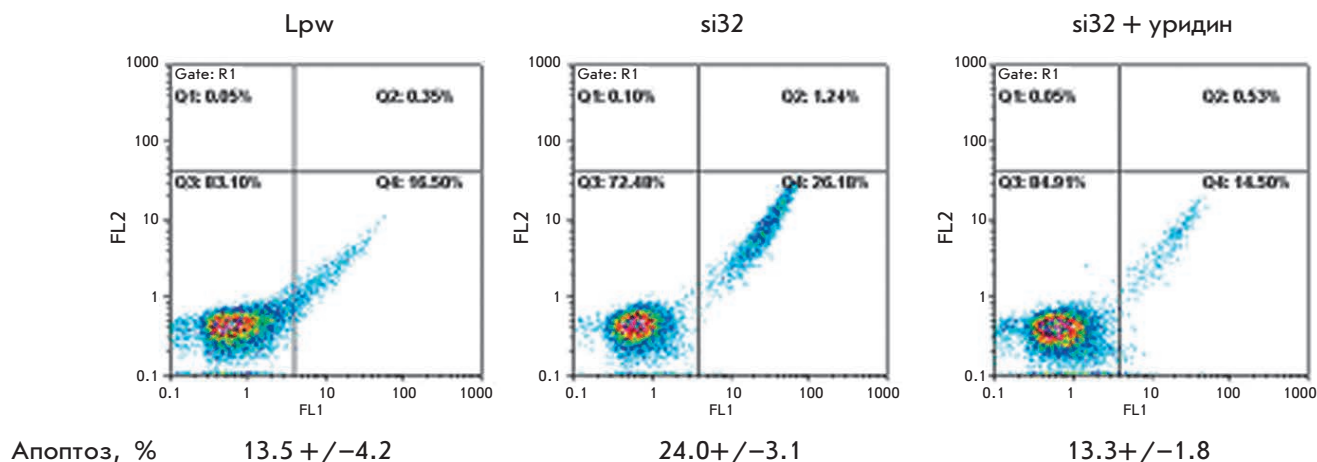


Рис. 5. Уридин защищает клетки RKO с нокдауном ДГОДГ от апоптоза. Уровень апоптоза клеток RKO контрольных (Lpw) или со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина (si32) или в присутствии уридина (si32 + уридин), оцененный методом проточной цитофлуориметрии. Результаты представлены в виде репрезентативной 2D-диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в каналах FL2 (Pr1) и FL1 (FITC-аннексин V). Внизу приведен процент апоптотических (аннексин V-положительных, Pr1-отрицательных) клеток (среднее значение +/- SD на основании трех независимых опытов)

боте показано, что апоптотическую гибель клеток, индуцируемую миксотиазолом, ингибитором комплекса III ДЦМ, полностью предотвращает уридин – предшественник биосинтеза уридилловых и цитидилловых нуклеотидов, и в значительной степени – оротат, продукт реакции, катализируемой дигидрооротат-дегидрогеназой. В то же время дигидрооротат, субстрат ДГОДГ, таким свойством не обладает. Из этих данных следует, что апоптотическая гибель клеток при ингибировании комплекса III ДЦМ действительно обусловлена ингибированием ДГОДГ, митохондриального фермента пути биосинтеза пиримидинов *de novo*. Этот вывод подтвержден результатами опытов по подавлению экспрессии ДГОДГ с помощью РНК-интерференции. Оказалось, что нокдаун ДГОДГ приводит к аккумуляции опухолевого супрессора p53 и увеличению уровня программируемой клеточной смерти – апоптоза.

На рис. 6 приведена предполагаемая схема событий, приводящих к апоптозу, при ингибировании комплекса III ДЦМ. В нормальных условиях убихинон принимает электроны от комплекса I, комплекса II и дигидрооротат-дегидрогеназы. При этом убихинон восстанавливается до убихинола, который затем отдает электроны через комплекс III на цитохром c (рис. 6А). Ингибирование комплекса III ДЦМ под действием миксотиазола приводит к блокированию окисления убихинола, убихинон переходит в полностью восстановленное состояние, после чего теряет способность акцептировать электроны

в процессе окисления дигидрооротата. Это приводит к нарушению работы ДГОДГ и, как следствие, нарушению биосинтеза пиримидинов *de novo*, стабилизации и активации опухолевого супрессора p53 и индукции программируемой клеточной смерти (рис. 6Б). Значимость регенерации убихинона в дыхательной цепи для биосинтеза пиримидинов *de novo* подтверждается тем, что, как установлено недавно, малярийный паразит *Plasmodium falciparum*, по-видимому, поддерживает активную митохондриальную электрон-транспортную цепь исключительно для этой цели [9].

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными о том, что ингибитор ДГОДГ лефлюномид/терифлюномид вызывает апоптоз в ряде раковых клеточных линий человека [10–12]. Однако, согласно работе [12], трансформированные кератиноциты с мутантным геном p53, в которых отсутствует транскрипционно активный p53, более чувствительны к апоптозу, вызванному терифлюномидом, чем нормальные кератиноциты с p53 дикого типа. Длительная обработка нормальных кератиноцитов ННЕК терифлюномидом вызывала задержку клеточного цикла в фазе G₀/G₁, что коррелирует с индукцией экспрессии ингибитора циклинзависимых киназ p21, гена-мишени p53 и свидетельствует о цитопротекторной роли p53 при индуцированном терифлюномидом апоптозе [12]. Обработка фибробластов человека PALA, другим ингибитором биосинтеза пиримидинов (N-phosphonacetyl-L-aspartate, ингибитор транскар-

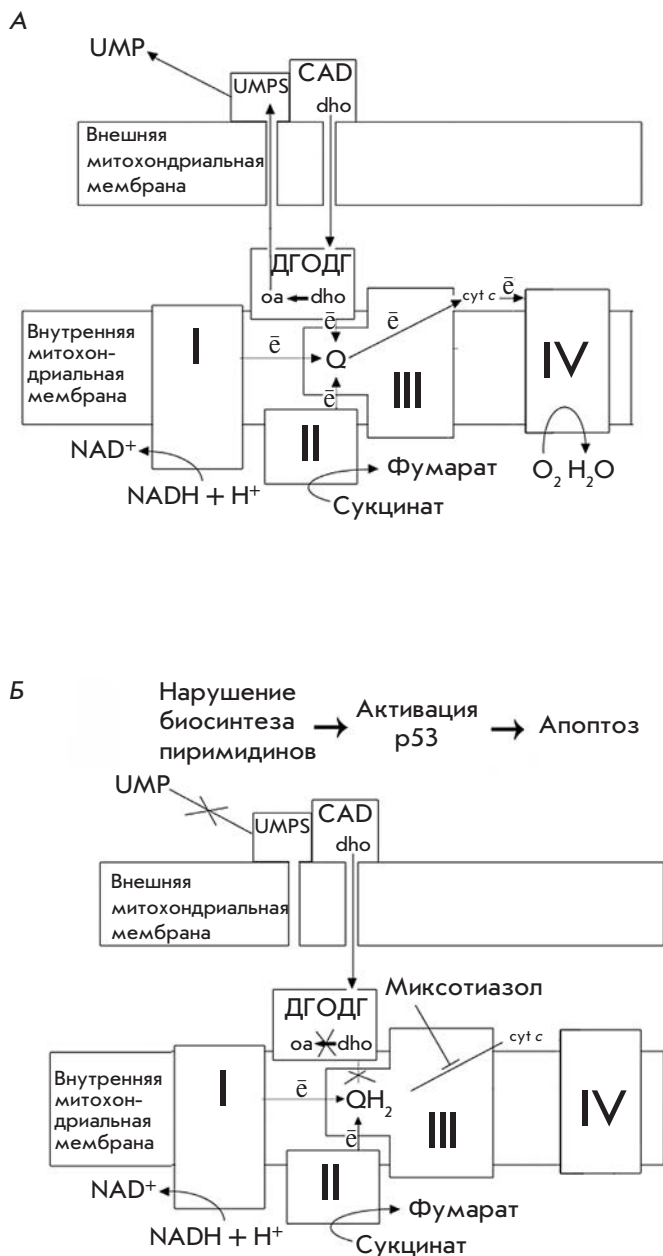


Рис. 6. Схема индукции p53-зависимого апоптоза в ответ на ингибирование комплекса III ДЦМ через блокирование работы ДГОДГ. I, II, III, IV – комплексы ДЦМ; Q – убинон; QH₂ – убинол; cyt c – цитохром c; ДГОДГ – дигидрооратдегидрогеназа; dhc – дигидроорат; oa – оротат; CAD – многофункциональный фермент, катализирующий начальные ступени биосинтеза пиримидинов (карбамоилфосфатсинтаза, аспартат-транскарбамилаза, дигидрооратаза); UMP – уридинмонофосфат; UMPS – уридилмонофосфатсинтаза. Электроны показаны как e. А – контрольные клетки, Б – клетки после обработки мисонитазолом. Объяснения в тексте статьи

бамилазы) приводила к обратимой задержке клеточного цикла и выживанию клеток, экспрессирующих транскрипционно активный p53, и к апоптотической гибели клеток в отсутствие p53 [13–15]. Предполагается, что в условиях подавленного биосинтеза пиримидинов цитопротекторные свойства p53, способствующие выживанию нормальных клеток с p53 дикого типа и гибели раковых клеток с инактивированным p53, могут стать основой для противоопухолевой терапии с использованием соответствующих ингибиторов [12].

В противоположность приведенным данным [12–15] в настоящей работе показано, что подавление функционирования ДГОДГ и нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo* приводит к индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека, экспрессирующих транскрипционно активный p53. Более того, ранее мы показали, что в клетках HCT116 p53^{-/-}, в которых отсутствует p53, наблюдается значительное подавление апоптоза по сравнению с клетками HCT116 дикого типа [5]. Следовательно, в использованных нами опухолевых клетках p53 выполняет не цитопротекторную функцию, а, наоборот, способствует индукции апоптоза при нарушении биосинтеза пиримидинов *de novo*. Расхождение наших результатов с результатами работ [12–15] может быть следствием тканеспецифических вариаций и требует дальнейшего изучения.

Наши данные, как одно из следствий, указывают на возможность использования ингибиторов биосинтеза пиримидинов при экспрессирующих p53 дикого типа злокачественных опухолях толстого кишечника человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован механизм включения программируемой клеточной смерти при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий. Показано, что причиной индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий является нарушение работы митохондриального фермента дигидрооратдегидрогеназы, ведущее к блокированию пути биосинтеза пиримидинов *de novo*, активации опухолевого супрессора p53 и, как следствие, индукции p53-зависимого апоптоза.

Наши результаты не согласуются с опубликованными ранее данными, согласно которым в кератиноцитах и фибробластах человека опухолевый супрессор p53 играет цитопротекторную роль и защищает клетки от апоптоза, индуцированного ингибиторами биосинтеза пиримидинов. Мы показали, что подавление функционирования ДГОДГ и нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo* приводит к индукции

апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека, экспрессирующих транскрипционно активный p53. В использованных нами клеточных линиях, напротив, p53 способствует индукции апоптоза при нарушении биосинтеза пиримидинов *de novo*. Расхождение наших и ранее опубликованных результатов может быть следствием тканеспецифических вариаций и требует дальнейшего изучения. Полученные нами данные указывают на возможность использо-

вания ингибиторов биосинтеза пиримидинов при экспрессирующих p53 дикого типа опухолях толстого кишечника человека. ●

Работа поддержана РФФИ (гранты № 12-04-01444, 12-04-00538 и 12-04-32131-мол_а), а также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственный контракт П334, 2010–2012 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. № 5. P. 551–560.
2. Meunier B., Fisher N., Ransac S., Mazat J.P., Brasseur G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1827. № 11–12. P. 1346–1361.
3. Trifunovic A., Larsson N.-G. // *J. Intern. Med.* 2008. V. 263. № 2. P. 167–178.
4. Чумаков П.М. // *Успехи биол. химии.* 2007. Т. 47. № 1. С. 3–52.
5. Khutorenko A.A., Roudko V.V., Chernyak B.V., Vartapetian A.B., Chumakov P.M., Evstafieva A.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 29. P. 12828–12833.
6. Evans D.R., Guy H.I. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 32. P. 33035–33038.
7. Sukhacheva E.A., Evstafieva A.G., Fateeva T.V., Shakulov V.R., Efimova N.A., Karapetian R.N., Rubtsov Y.P., Vartapetian A.B. // *J. Immunol. Meth.* 2002. V. 266. № 1–2. P. 185–196.
8. Гурьянова О.А., Маханов М., Ченчик А.А., Чумаков П.М., Фролова Е.И. // *Молекуляр. биология.* 2006. Т. 40. № 4. С. 448–459.
9. Painter H.J., Morrisey J.M., Mather M.W., Vaidya A.B. // *Nature.* 2007. V. 446. № 1. P. 88–91.
10. Baumann P., Mandl-Weber S., Völkl A., Adam C., Bumeder I., Oduncu F., Schmidmaier R. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 3. P. 366–375.
11. Hail N.Jr., Chen P., Bushman L.R. // *Neoplasia.* 2010. V. 12. № 4. P. 464–475.
12. Hail N.Jr., Chen P., Кепа J.J., Bushman L.R. // *Apoptosis.* 2012. V. 17. № 2. P. 258–268.
13. Agarwal M.L., Agarwal A., Taylor W.R., Chernova O., Sharma Y., Stark G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 25. P. 14775–14780.
14. Agarwal M.K., Hastak K., Jackson M.W., Breit S.N., Stark G.R., Agarwal M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 44. P. 16278–16283.
15. Hastak K., Paul R.K., Agarwal M.K., Thakur V.S., Amin A.R., Agrawal S., Sramkoski R.M., Jacobberger J.W., Jackson M.W., Stark G.R., Agarwal M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 17. P. 6314–6319.

УДК 571.27; 579

Индукция иммунного ответа к *Bacillus anthracis* при интраназальном введении рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего протективный антиген, слитый с Fc-фрагментом антитела IgG2a

Д. Н. Щербинин¹, И. Б. Есмагамбетов¹, А. Н. Носков¹, Ю. О. Селянинов², И. Л. Тутыхина¹, М. М. Шмаров¹, Д. Ю. Логунов¹, Б. С. Народицкий¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, 601120, Покров Петушинского р-на Владимирской обл.

*E-mail: dim284@inbox.ru

Поступила в редакцию 13.08.2013

РЕФЕРАТ Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание человека и сельскохозяйственных животных, протекающее в кожной или септической форме и характеризующееся интоксикацией, развитием серозно-геморрагического воспаления кожи, лимфатических узлов и внутренних органов. Возбудитель сибирской язвы – грамположительная капсулообразующая аэробная палочка *Bacillus anthracis*. Для предотвращения заболеваний людей сибирской язвой необходимы эффективные вакцинные препараты, способные быстро индуцировать стойкий иммунный ответ. В данной работе сконструированы три рекомбинантных аденовируса человека серотипа 5, содержащих различные модификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих четвертый домен протективного антигена (РА). Все три модификации протективного антигена – секретлируемый (Ad-sPA), несекретлируемый (Ad-cPA) и протективный антиген, соединенный с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a (Ad-PA-Fc), обладали защитными свойствами против *B. anthracis*. Наиболее высокий уровень протекции, выразившийся в способности защищать мышей от гибели после заражения летальной дозой *B. anthracis*, индуцировал рекомбинантный аденовирус Ad-PA-Fc. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что добавление к протективному антигену Fc-фрагмента антитела значительно увеличивает способность рекомбинантного аденовируса Ad-PA-Fc, содержащего данный ген, защищать от *B. anthracis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Bacillus anthracis*, иммунизация, протективный антиген, рекомбинантные аденовирусы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad – аденовирус; БОЕ – бляшкообразующая единица; РА – протективный антиген; Fc – Fc-фрагмент иммуноглобулина IgG2a; IFA – неполный адъювант Фрейнда; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus anthracis – грамположительная капсулообразующая аэробная палочка, вызывающая опасное инфекционное заболевание, поражающее восприимчивых животных и людей. Ежегодно во многих странах мира регистрируются случаи заболевания людей сибирской язвой. Попавшие в организм споры возбудителя сибирской язвы фагоцитируются макрофагами, которые затем мигрируют в региональ-

ные лимфоузлы [1]. В макрофагах споры переходят в вегетативную форму, что приводит к развитию системной инфекции. Из-за наличия у *B. anthracis* комплекса факторов патогенности сибирская язва нередко протекает в острой форме с высоким уровнем летальных исходов, если не приняты своевременные лечебно-профилактические мероприятия [2–5].

Проблема профилактики сибирской язвы остается актуальной и в настоящее время в связи с еже-

годными спорадическими вспышками болезни среди людей, в том числе со смертельными исходами [6, 7]. С целью специфической профилактики сибирской язвы на территории России используют вакцину на основе бескапсульного штамма СТИ-1. Однако живая вакцина СТИ-1 имеет ряд недостатков, включая необходимость ежегодной ревакцинации, реактогенность для отдельных индивидов, отсутствие напряженного иммунитета против некоторых полевых изолятов, циркулирующих на территории РФ [8–12]. Применяемая в США химическая вакцина также далеко не совершенна – для создания напряженного иммунитета ее нужно вводить шестикратно в течение 18 месяцев, что вызывает алергизацию ревакцинируемого организма. С учетом этого задача совершенствования противосибиреязвенных вакцин остается актуальной для медицинской и ветеринарной практики, поэтому ведется постоянный поиск новых средств специфической профилактики сибирской язвы.

Одна из первых попыток использования аденовирусных векторов для иммунизации лабораторных животных против *B. anthracis* была предпринята группой исследователей из США под руководством М.Дж. McConnell [13]. Эти ученые добились экспрессии секреторируемой формы четвертого домена протективного антигена с использованием рекомбинантного аденовирусного вектора и показали, что однократная иммунизация экспериментальных животных с последующим введением летальной дозы сибиреязвенного токсина обеспечивает 67% защиту мышей линии Balb/c. Эти первые данные показали, что аденовирусные векторы, несущие гены основных протективных антигенных детерминант, имеют хорошие перспективы использования для иммунизации против сибирской язвы.

Нами сконструированы рекомбинантные аденовирусы, способные индуцировать выработку специфического иммунного ответа против *B. anthracis*. Конструкция содержала вставку, кодирующую химерный белок, состоящий из четвертого домена протективного антигена (РА) и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG2a. Методами генной инженерии в качестве контроля были подготовлены два рекомбинантных аденовируса, несущих секреторируемую и несекреторируемую формы четвертого домена протективного антигена. Все три варианта обладали иммуногенными и протективными свойствами, индуцируя синтез специфических антител против *B. anthracis*. Однако рекомбинантный аденовирус, содержащий вставку, кодирующую химерный белок (Ad-РА-Fc), проявил наиболее сильную степень защиты по сравнению с контрольными аденовирусами Ad-sРА и Ad-cРА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструкция рекомбинантных аденовирусов

С использованием *in silico*-анализа проведена оптимизация кодонов в гене протективного антигена. Кодоны в гене РА-Fc были адаптированы к экспрессии в клетках *Mus musculus*, при этом использовали два наиболее часто встречающихся аминокислотных триплета. Наиболее часто встречающиеся кодоны *M. musculus* были определены согласно базе данных <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Модифицированная нуклеотидная последовательность, кодирующая четвертый домен РА, связанный с Fc-фрагментом антитела, синтезирована компанией ЗАО «Евроген» и доставлена нам в составе плазмиды pAtlas-РА-Fc.

Фрагмент РА-Fc был субклонирован по NotI- и HindIII-сайтам в челночный вектор pShuttle-CMV для получения челночной плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc. Затем из плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc путем рестрикции и последующего лигирования получены челночные плазмиды pShuttle-sРА и pShuttle-CMV-cРА. pShuttle-CMV-sРА получили путем расщепления плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc рестриктазой XhoI с последующим лигированием липких концов. Соответствующий C-концевой XhoI-сайт рестрикции располагался в последовательности ТААСТСГAGТAAAAGСТТ таким образом, что после удаления Fc-фрагмента образуется новый стоп-кодон. pShuttle-cРА получен из плазмиды pShuttle-CMV-sРА путем удаления участка, содержащего лидерный пептид tra рестриктазами NotI и NdeI.

Для получения рекомбинантных аденовирусов Ad-РА-Fc, Ad-cРА и Ad-sРА методом гомологичной рекомбинации в клетках *Escherichia coli* использовали систему AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). С этой целью плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc, pShuttle-CMV-cРА и pShuttle-CMV-sРА линейаризовали ферментом PmeI, смешивали с конструкцией pAd-Easy и котрансформировали в клетки *E. coli* (штамм ВJ5183). Из полученных рекомбинантных клонов выделяли плазмидные ДНК и определяли их молекулярные массы. Плазмидами размером более 20 т.п.н. трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5alpha, в котором, в отличие от штамма ВJ5183, возможна препаративная наработка рекомбинантных плазмид. Очищенные плазмидные клоны анализировали, расщепляя рестриктазой HindIII, а также методом ПЦР.

На следующем этапе изучали инфекционность описанных плазмид для перmissive клеток. Клетки линии 293 трансфицировали плазмидами pAd-РА-Fc, pAd-sРА и pAd-cРА, линейаризованными по PacI-сайтам. Трансфекцию проводили в 24-луночной планшете с использованием реактива

Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Через 10 дней после трансфекции клетки собирали, замораживали–оттаивали, полученным лизатом, содержащим рекомбинантные аденовирусы, заражали клетки линии 293 в 35-мм чашке. Через 5 дней наблюдали специфический лизис клеток, обусловленный цитопатическим действием рекомбинантных аденовирусов. Из лизата клеток выделяли ДНК и анализировали методом ПЦР. В лизате клеток выявлена ДНК рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5, несущего вставки, кодирующие протективный антиген.

Накопление вирусов

Рекомбинантные аденовирусы человека серотипа 5 накапливали в культуре клеток линии 293. Монослой клеток с конфлюэнтностью 50–70% заражали лизатом клеток 293, зараженных рекомбинантными Ad, в дозе 10^7 БОЕ на 15-см чашку. Через 2 сут инфицированные клетки снимали, концентрировали низкоскоростным центрифугированием, суспендировали в буфере (0.01 М Трис–HCl pH 8.0, 0.01 М NaCl, 5 мМ EDTA) и разрушали с помощью трехкратного замораживания–оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при +4°C, осадок удаляли. Рекомбинантные аденовирусы, находящиеся в надосадочной жидкости, очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия. В результате были получены три рекомбинантных аденовируса человека серотипа 5, несущие различные вставки: Ad-sPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc. Титры препаратов рекомбинантных аденовирусов определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

Экспрессия рекомбинантных белков из аденовирусного вектора

Экспрессию трех рекомбинантных белков, в состав которых входит антиген PA *B. anthracis*, определяли методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител против протективного антигена. В качестве положительного контроля использовали препарат протективного антигена, приобретенный в фирме Calbiochem (кат. номер 176908-100UG). Для этого рекомбинантными аденовирусами трансдуцировали клетки линии A549, через 2 сут определяли экспрессию протективного антигена в надосадочной жидкости и лизированном клеточном осадке. Fc-домен антитела в составе слитого белка оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием меченных пероксидазой хрена антивидовых антител к IgG мышей (Amersham).

Продукция протективного антигена в *E. coli*

Плазмиду, несущую ген рецепторного домена, конструировали на основе коммерческих векторов

pUC19 и pET28b (Novagen). В качестве матрицы использовали суммарную ДНК, выделенную из штамма *B. anthracis* 71/1. Клонирование проводили по сайтам NdeI и EcoRI. При клонировании были использованы следующие праймеры (5'–3'): для PAGR4: прямой – GAGATCATATGGTTGGGGCGGATGAG и обратный – ATCTCGAATTCTTATCSTATTCATAGCC. ПЦР-фрагменты выделяли с помощью наборов (GE, Inc.) согласно прилагаемой инструкции. Фрагменты, полученные после рестрикции NdeI и EcoRI (Fermentas), клонировали в вектор pUC19 (реципиент *E. coli* JM109), а затем в вектор pET28b. Для выделения рекомбинантных белков клетки *E. coli* BL21 трансформировали сконструированными векторами. Бактериальные культуры культивировали на LB-бульоне до поглощения $A_{600} = 0.6–0.8$, после чего добавляли IPTG (Sigma) до концентрации 10 мМ и культивировали в течение еще 3.5–4 ч. Бактериальную массу концентрировали центрифугированием в течение 15 мин при 8000 g, и бактериальные клетки ресуспендировали в PBS. Затем клетки разрушали ультразвуком (3 раза по 30 с на дезинтеграторе MSE (England)) и выделяли тельца включения двойным центрифугированием по 40 мин при 20000 g. Полученный осадок телец включения растворяли в 8 М растворе мочевины, а рекомбинантные белки выделяли согласно инструкции, прилагаемой к Ni-NTA-сефарозе (Invitrogen) с применением тромбина (Sigma).

Иммуногенность

Иммуногенность рекомбинантных аденовирусов, кодирующих антигены *B. anthracis*, оценивали на мышинной модели. Мышей линии Balb/c иммунизировали рекомбинантными аденовирусами дважды с интервалом в 2 недели. В качестве положительного контроля был использован полноценный белок протективного антигена, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда, который вводили подкожно. Отрицательным контролем служил рекомбинантный аденовирус, не содержащий антигена (Ad-null). Иммунизацию рекомбинантными аденовирусами проводили интраназально, в дозе 4.6×10^9 БОЕ/мышь, в объеме 100 мкл. Через 2 недели после второй иммунизации брали пробы крови, из нее получали сыворотку, в которой в дальнейшем определяли наличие специфических антител.

Иммунизация

Экспериментальных животных иммунизировали интраназально рекомбинантными аденовирусными векторами в дозе 15×10^9 БОЕ/мышь. Протективный антиген с адьювантом Фрейнда вводили подкожно в дозе 8–10 мкг.

Экспериментальные животные

В работе были использованы самки мышей линии Balb/c массой 20 г.

Заражение животных

Для оценки протективных свойств потенциальных генетических вакцин иммунизированных животных заражали путем интраперитонеальной инокуляции заражающей тест-культуры в дозе 4 LD₅₀. В качестве заражающей культуры использовали бескапсульный штамм *Sterne B. anthracis*. Наблюдение за животными опытных и контрольных групп проводили в течение 10 сут после заражения. Все эксперименты с животными проводили в институте ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Результаты сравнения экспериментальных и контрольных групп считали статистически достоверными при $p < 0.05$. Результаты по выживаемости оценивались с применением критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование рекомбинантных аденовирусов

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности четвертого домена антигена PA получены из UniProtKB/Swiss-Prot P13423 и GenBank M22589.1. Анализ кодонов PA *B. anthracis* показал, что многие кодоны не оптимальны для экспрессии в клетках млекопитающих. Наиболее часто встречающиеся кодоны *B. anthracis* и *M. musculus* были определены согласно базе данных используемых кодонов <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. С целью обеспечения высокого уровня продукции белка кодоны были оптимизированы для трансляции в клетках *M. musculus*. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности Fc-фрагмента IgG2a получены из UniProtKB/Swiss-Prot P01863 и GenBank V00798.1. Между PA-антигеном и Fc-фрагментом антитела был встроен 12-членный глицин-сериновый спейсер (*рис. 1*). Три челночных вектора были сконструированы на основе одной плазмиды pShuttle-CMV-PA-Fc, из которой последовательно удаляли отдельные фрагменты.

Характеристика *in vitro* Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc

Чтобы получить данные об экспрессии и секреции PA в составе рекомбинантного аденовируса, клетки A549 были трансдуцированы тремя аденовирусными конструкциями. В качестве положительного контроля мы использовали четвертый домен про-

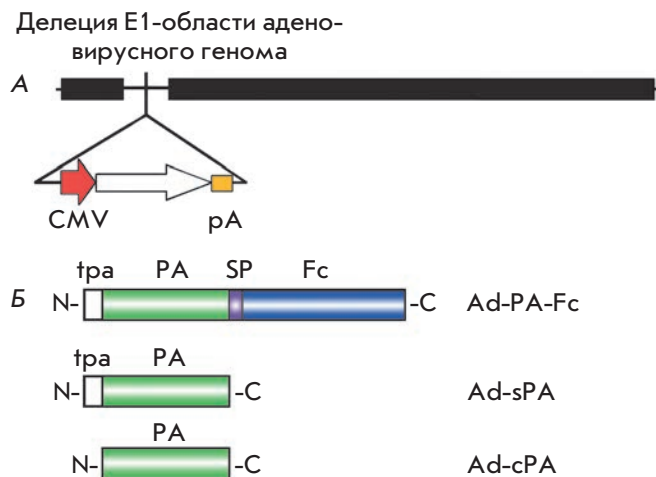


Рис. 1. Схема геномов рекомбинантных аденовирусов, несущих протективный антиген *B. anthracis*. А – геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5. На месте делеции E1 области аденовирусного генома вставлена экспрессионная кассета. CMV – промотор цитомегаловируса; pA – сигнал полиаденилирования. Б – схемы строения антигенов. tpa – сигнальный пептид активатора плазминогена тканевого типа, PA – протективный антиген, SP – глицин-сериновый спейсер, Fc – Fc-фрагмент антитела IgG2a

тективного антигена, продуцируемый в *E. coli*. После инкубации в течение 48 ч в надосадочной жидкости от инфицированных клеток и в клеточном осадке методом иммуноблотинга анализировали присутствие четвертого домена протективного антигена (*рис. 2*). Надосадочная жидкость от клеток, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-PA-Fc (дорожки 3, 4), а также лизированные клетки, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad-cPA (дорожка 2), содержали четвертый домен протективного антигена. Положительный результат получен и при определении очищенного четвертого домена протективного антигена, синтезированного в *E. coli* (дорожка 1).

Характеристика иммунного ответа, индуцируемого рекомбинантными аденовирусами Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc, *in vivo*

Иммунный ответ на четвертый домен протективного антигена, экспрессируемого в составе рекомбинантных аденовирусов, оценивали на мышях линии Balb/c. Мышей двукратно иммунизировали с интервалом 2 недели. Спустя 10 дней после второй иммунизации у мышей отбирали кровь и методом ИФА в сыворотке выявляли специфические антитела к PA (*рис. 3*). Сыворотка крови мышей, инфицированных

рекомбинантным аденовирусом Ad-cPA, неожиданно для нас содержала специфические антитела в наибольшей концентрации, сходной с концентрацией у мышей, иммунизированных непосредственно РА с неполным адъювантом Фрейнда. Сыворотки крови мышей, инфицированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-PA-Fc, содержали специфические антитела к РА в меньшей концентрации, но уровень их был примерно одинаковым.

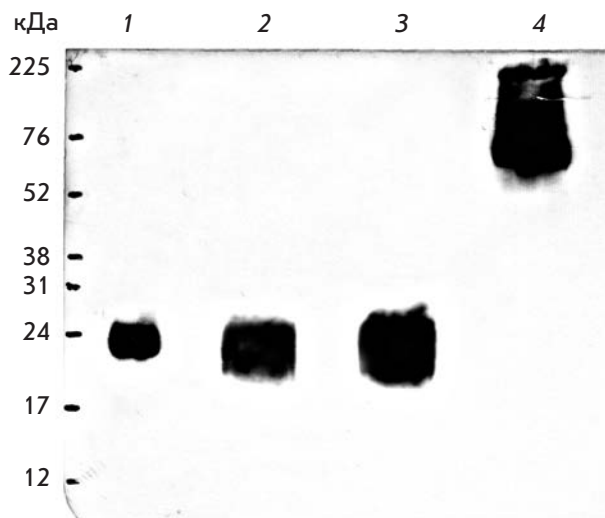


Рис. 2. Результаты выявления РА методом вестерн-блоттинга. 1 – очищенный четвертый домен рецепторного антигена, продуцируемый в клетках *E. coli*; 2 – лизат клеток, инфицированных Ad-cPA; 3 – супернатант от Ad-sPA-трансдуцированных клеток; 4 – супернатант от Ad-PA-Fc-трансдуцированных клеток

Определение подклассов специфических иммуноглобулинов IgG

В сыворотках, полученных в предыдущем опыте, определяли присутствие подклассов специфических иммуноглобулинов (IgG) к РА-антигену (рис. 4). Показано, что все рекомбинантные аденовирусы индуцируют выработку высоких уровней IgG2a и IgG1 (рис. 4А,Б). В сыворотках крови мышей, иммунизированных Ad-cPA и Ad-Fc-РА, также присутствуют антитела подкласса IgG2b (рис. 4Г). IgG3 не обнаружены в сыворотках крови животных ни одной из групп, включая положительный контроль (рис. 4В). Интересно, что иммунизация РА с неполным адъювантом Фрейнда не индуцировала синтез IgG2a, но вызывала синтез иммуноглобулинов подклассов IgG2b и IgG1.

Проверка защитных свойств рекомбинантных аденовирусов методом контрольного заражения

Для оценки протективной активности гуморального иммунного ответа, индуцируемого сконструированными рекомбинантными аденовирусами, иммунизированных мышей заражали летальной дозой *B. anthracis* штамм *Sterne* (4 LD₅₀). В течение 1 недели после заражения пали 80% животных контрольной группы, вакцинированных рекомбинантным аденовирусом без вставки (Ad-null). Все генетические конструкции, содержащие РА, обеспечили защиту животных от заражения *B. anthracis* на уровне 80–90% (табл. 1).

Предварительную оценку продолжительности сохранения напряженного противосибиреязвенного иммунитета проводили по следующей схеме (рис. 5). С интервалом в 2 недели мышей линии Balb/c иммунизировали рекомбинантными аденовирусами в дозе

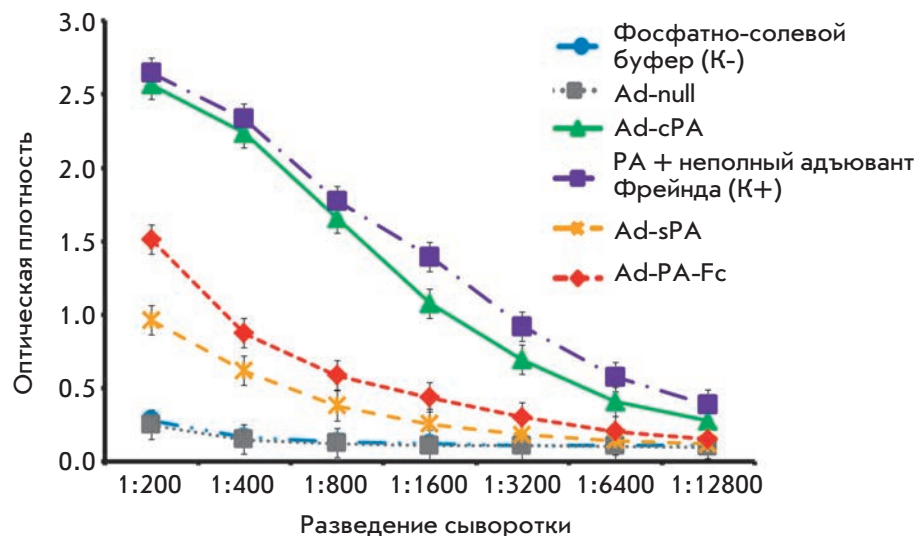


Рис. 3. Результаты выявления антител к РА в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами, методом ИФА. Ad-PA-Fc – рекомбинантный аденовирус, содержащий РА, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a; Ad-cPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий несекретируемую форму РА; Ad-sPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий секретируемую форму РА. Положительный контроль – белок РА, смешанный с неполным адъювантом Фрейнда. Отрицательный контроль – фосфатно-солевой буфер (PBS)

Таблица 1. Протективное действие генетических вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов на модели инbredных белых мышей линии Balb/c

Группа животных	Иммунизирующий препарат	Мыши Balb/c	Выжило	Пало	Защита, %
1	РА + IFA	10	3	7	30
2	Ad-PA-Fc	10	9	1	90
3	Ad-cPA	10	8	2	80
4	Ad-sPA	10	8	2	80
5	Ad-null	10	2	8	20

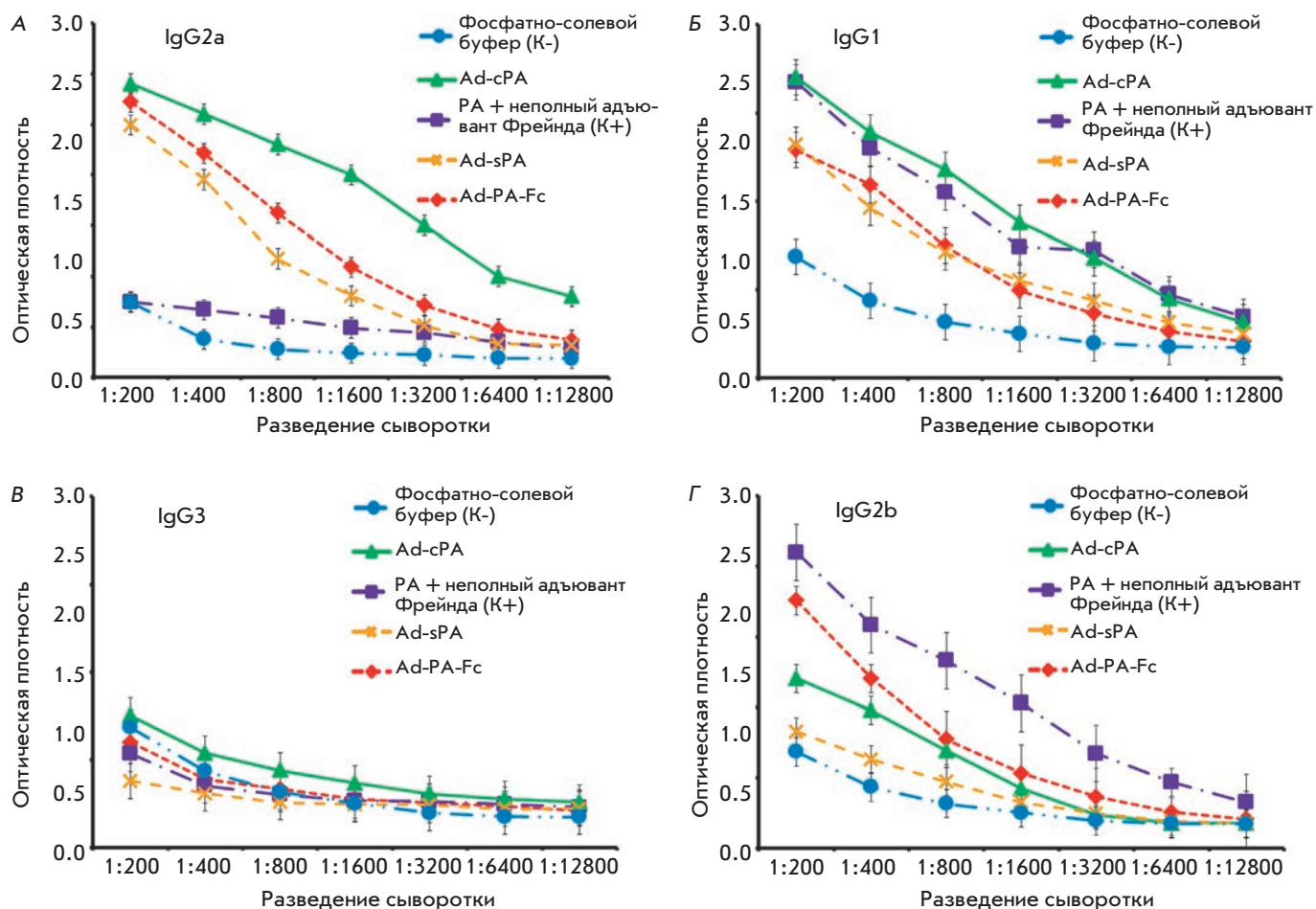


Рис. 4. Результаты выявления методом ИФА подклассов специфических IgG к РА в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-Fc-РА. А – количество специфических к РА иммуноглобулинов класса IgG2a; Б – IgG1; В – IgG3; Г – IgG2b. Ad-PA-Fc – рекомбинантный аденовирус, содержащий РА, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a; Ad-cPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий несекретируемую форму РА; Ad-sPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий секретируемую форму РА. Положительный контроль – белок РА, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда. Отрицательный контроль – фосфатно-солевой буфер (PBS)

4.6×10^9 БОЕ/мышь, после чего через 88 дней их заразили культурой *B. anthracis* штамм *Sterne* ($4 LD_{50}$). Из табл. 2 видно, что после введения *B. anthracis* штамм *Sterne* выжили 90–100% мышей, привитых рекомбинантными аденовирусами. Группа мышей,

которым вводили рекомбинантный аденовирус Ad-PA-Fc, характеризовалась более высокой степенью защиты, чем группы мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-cPA. Более того, мыши, иммунизированные Ad-sPA и Ad-

Таблица 2. Протективные свойства генетических вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов на модели инбредных белых мышей линии Balb/c

Группа животных	Иммунизирующий препарат	Мыши, количество	Выжило	Пало	Защита, %
1	Ad-PA-Fc	9	9	0	100
2	PA + IFA	9	9	0	100
3	Ad-sPA	9	8	1	89
4	Ad-cPA	9	8	1	89
5	Ad-null	9	1	8	11.1
6	PBS	9	1	8	11.1



Рис. 5. Схема постановки эксперимента по защите иммунизированных животных от *B. anthracis*. Иммунизацию рекомбинантными аденовирусами проводили интраназально в дозе 4.6×10^9 БОЕ/мышь, в объеме 100 мкл. В качестве положительного контроля был использован полноценный белок PA с неполным адьювантом Фрейнда

cPA, теряли в весе и имели признаки болезненного состояния, в отличие от мышей, иммунизированных Ad-PA-Fc.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые Y. Tan в 2003 году сконструировал рекомбинантный аденовирус серотипа 5, кодирующий адаптированный для экспрессии в клетках человека протективный антиген [14]. Было показано, что внутримышечное введение 10^9 вирусных частиц индуцирует выработку анти-PA-антител, количество которых в 2.7 раза больше, чем при иммунизации субъединичной вакциной, применяемой для вакцинации людей в США. Примечательно, что рекомбинантный аденовирус индуцировал более быстрое формирование гуморального иммунного ответа, чем субъединичная вакцина. При иммунизации мышей с последующим введением сибиреязвенного токсина наблюдали защиту 75% экспериментальных животных, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, тогда как субъединичная вакцина обеспечила только 25% защиты.

В 2005 году группой тех же авторов подобная работа была проделана на рекомбинантном аденовирусе серотипа 7 [15]. Они показали, что предсуществующий иммунный ответ к аденовирусу серотипа 5 у мышей преодолевается использованием аденовируса другого серотипа, и это позволяет защитить животных от летальной дозы сибиреязвенного токсина.

В качестве антигена использовали также не полную аминокислотную последовательность протективного антигена, а только его четвертый домен. Это было сделано с учетом того, что этот домен необходим для связывания с клеточным рецептором и, следовательно, блокируя антителами этот домен, можно добиться защитного иммунного ответа. Например, Y.Z. Yu и соавт. сконструировали две плазмиды, несущие секретлируемую и несекретлируемую формы четвертого домена протективного антигена [16]. После вакцинации животных этими плазмидами, значительно увеличился уровень интерферона γ (IFN- γ) и индуцировалась секреция анти-PA-антител. В другом исследовании M.J. McConnell и соавт. [13] экспрессировали четвертый домен протективного антигена, кодируемого аденовирусным вектором. При однократной иммунизации экспериментальных животных с последующим введением летальной дозы сибиреязвенного токсина удалось добиться 67% защиты. В следующей работе эти авторы изучали протективное действие рекомбинантного аденовируса при заражении мышей летальной дозой вакцинного штамма 34F2 [17]. Они применили стратегию иммунизации типа прайм-буста. Праймирование иммунитета плазмидной ДНК с последующим бустированием рекомбинантным аденовирусом, так же как праймирование макроорганизма рекомбинантным аденовирусом с последующим бустированием рекомбинантным аденовирусом, полностью защищало мышей от *B. anthracis*. Эти результаты показывают, что вак-

цинация рекомбинантным аденовирусом защищает от заражения сибирской язвой, и этот подход может быть эффективным в случае иммунизации против бактериальных и вирусных патогенов.

Отличительной чертой нашей работы было увеличение иммуногенности протективного антигена за счет его димеризации Fc-фрагментом антитела, а также способность этого фрагмента специфически связываться с макрофагами за счет Fc-рецепторов и активировать систему комплемента по классическому пути.

Способность к формированию димеров позволяет двум антигенным детерминантам располагаться на одной частице, что повышает степень иммуногенности димеризованного белка [18, 19]. Вероятным механизмом увеличения иммуногенности может быть активация многоцепочечных рецепторов иммунного распознавания (MIRR-receptors). MIRR-рецепторы при связывании лигандов сигнализируют при помощи ITAM-мотивов, активация которых приводит к поглощению иммунных комплексов и слиянию эндосом с МНСII-содержащими везикулами, содержащими молекулы главного комплекса тканевой совместимости [20, 21].

С другой стороны, если олигомеризующая основа химерного белка или сам антиген способны взаимодействовать с паттернраспознающим рецептором, то это позволяет максимально увеличить иммуногенность и уйти от применения дополнительного введения адъювантов [18]. В конечном итоге получается, что олигомеризующий белок выступает в роли «молекулярного адъюванта». В нашей работе к протективному антигену в слитый белок был добавлен Fc-фрагмент IgG2a *M. musculus*. Fc-фрагмент антитела способен приводить к активации классического пути системы комплемента, рецепторы которого являются паттернраспознающими и доставляют необходимый костимуляторный сигнал [22]. Результатом совместного действия на одной клетке MIRR- и паттернраспознающих рецепторов является презентация антигенных пептидов хелперным Т-лимфоцитам, способным оказывать помощь как Т-, так и В-клеткам. Возможно, благодаря этому рекомбинантный аденовирус, несущий PA-Fc, защищает сильнее, чем Ad-sPA и Ad-cPA (табл. 1).

Еще один важный момент – использование аденовирусного вектора в качестве носителя синтетического гена. Вследствие того, что синтез антигена происходит внутри трансдуцированных рекомбинантным аденовирусом клеток, часть молекул антигена подвергается процессингу и презентации пептидов в комплексе с молекулами МНС I-класса. Получившиеся на активированных клетках комплексы приводят к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов,

которые принимают участие в защите от внутриклеточных патогенов, в том числе и *B. anthracis* [14, 15, 23]. В нашей работе с целью оценки действия цитотоксических Т-лимфоцитов был сконструирован рекомбинантный аденовирус Ad-cPA, несущий не-секретируемый вариант протективного антигена, и показана его способность защищать 89% экспериментальных животных (табл. 2). С другой стороны, секретлируемый вариант протективного антигена (Ad-sPA) без добавления «молекулярных адъювантов» обеспечивал аналогичную степень защиты. Таким образом, полученные нами результаты полностью согласуются с результатами другой группы исследователей [16]. Мы полагаем, что использование рекомбинантных аденовирусных векторов Ad-sPA и Ad-cPA позволяет добиться индукции антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

В представленной работе мы использовали интраназальное введение аденовирусных векторов, поскольку именно такой способ доставки рекомбинантных аденовирусов помогает преодолевать предсуществующий иммунный ответ к вектору [24]. Интраназальное введение имеет некоторые преимущества перед другими путями введения: это безыгольный, неинвазивный, безболезненный метод, он не требует медицинского персонала и может использоваться самим вакцинируемым. Кроме того, данные, полученные J. Zhang и соавт. [24], показали, что единичная интраназальная иммунизация рекомбинантным аденовирусным вектором, несущим ген протективного антигена, защищает мышей от *B. anthracis* на фоне предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору.

Примечательна подклассовая принадлежность антител IgG к протективному антигену, индуцируемая при иммунизации рекомбинантными аденовирусами. В наших экспериментах были выявлены подклассы антител, вырабатываемые при развитии иммунного ответа по типу Th1 (максимум антител подкласса IgG2a), в то время как при использовании неполного адъюванта Фрейнда иммунный ответ проходит по типу Th2 (максимум антител подкласса IgG2b). Возможно, благодаря этому мыши, иммунизированные рекомбинантными аденовирусами в первом эксперименте, обладали большей степенью защиты по сравнению с положительным контролем (рис. 4; табл. 1). Наши результаты согласуются с данными группы Y. Tan [14], который показал аналогичный профиль подклассов антител при аденовирусной иммунизации. Отличительной особенностью нашей работы было лишь полное отсутствие IgG3, в то время как у Y. Tan данный подкласс антител присутствовал, но в значительно меньших количествах, чем других IgG.

Интересно, что к протективному антигену *B. anthracis* могут вырабатываться два типа антител. Первые способны связывать единичные молекулы РА и нейтрализовать их, т.е. стерически блокировать белок-белковые взаимодействия между молекулами РА. Антитела второго типа взаимодействуют только с олигомерными комплексами протективного антигена и изменяют их структуру так, что они не могут взаимодействовать с рецепторами на клетках [25], т.е. антитела второго типа вырабатываются только в присутствии олигомеризованных молекул антигена, комплекс которых пронизывает мембраны эукариотических клеток. Так как четвертый домен РА располагается на С-конце белка, а в нашей конструкции (РА-Fc) находится на N-конце (для функциональной активности Fc-фрагмента антитела), мы сконструировали рекомбинантный аденовирус, несущий Fc-фрагмент на N-конце белка, а четвертый домен РА на С-конце белка. Полученный рекомби-

нантный аденовирус (Ad-Fc-РА) исследовали в описанных экспериментах. Оказалось, что он обладал такими же иммуногенными и протективными свойствами, как и рекомбинантный аденовирус Ad-РА-Fc (данные не показаны).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что иммунизация рекомбинантным аденовирусом может обеспечивать защиту против заражения бескапсульным штаммом *B. anthracis*. Ad-РА-Fc, несущий Fc-фрагмент антитела, соединенный с протективным антигеном, обеспечивает более высокую степень защиты по сравнению с Ad-sРА и Ad-cРА. Кроме того, иммунизация Ad-РА-Fc способна полностью защищать мышей в течение 3 месяцев после иммунизации. В дальнейшем мы планируем перейти к опытам на морских свинках с использованием спор капсулообразующих штаммов *B. anthracis*. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guichard A., Nizet V., Bier E. // *Microbes Infect.* 2012. V. 14. № 2. P. 97–118.
- Brachman P.S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980. № 353. P. 83–93.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1982. № 28. P. 291–298.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1983. № 29. P. 8–12.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1985. № 31. P. 176–180.
- Metcalfe N. // *Occup. Med.* 2004. V. 54. № 7. P. 489–493.
- Meaney-Delman D., Zotti M.E., Rasmussen S.A., Strasser S., Shadomy S., Turcios-Ruiz R.M., Wendel G.D., Treadwell T.A., Jamieson D.J., Gladus M.A., et al. // *Obstet. Gynecol.* Dec. 2012. V. 120. № 6. P. 1439–1449.
- Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Маничев А.А., Бастаров С.И., Саленко Л.С., Яковлева Т.Н., Степанова В.В., Шморгун Б.И., Киселев Ю.Т., Сайиткулов Б.С. // *Ветеринария.* 1995. № 5. С. 27–30.
- Auerbach S., Wright G.G. // *J. Immunol.* 1955. V. 75. № 2. P. 129–133.
- Broster M.G., Hibbs S.E. // *Salisbury Med. Bull. Sp. Suppl.* 1990. № 68. P. 91–92.
- Little S.F., Knudson G.B., Neidhardt F.C. // *Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* 1984. P. 46.
- Ward M.K., McGann V.G., Hogge A.L., Huff M.L., Kanode R.G., Roberts E.O. // *J. Infect. Dis.* 1965. № 115. P. 59–67.
- McConnell M.J., Hanna P.C., Imperiale M.J. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 2. P. 1009–1015.
- Tan Y., Hackett N.R., Boyer J.L., Crystal R.G. // *Hum. Gene. Ther.* 2003. V. 14. № 17. P. 1673–1682.
- Hashimoto M., Boyer J.L., Hackett N.R., Wilson J.M., Crystal R.G. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. № 10. P. 6885–6891.
- Yu Y.Z., Li N., Wang W.B., Wang S., Ma Y., Yu W.Y., Sun Z.W. // *Vaccine.* 2010. V. 28. № 47. P. 7529–7535.
- McConnell M.J., Hanna P.C., Imperiale M.J. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. 203–210.
- Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Рубакова Э.И., Кондратьева Т.К. // *Туберкулез и болезни легких.* 2010. Т. 87. № 10. С. 50–53.
- Щербинин Д.Н., Турыхина И.Л., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Апт А.С., Кондратьева Т.К., Народицкий Б.С. // *Мед. иммунол.* 2011. Т. 13. № 4–5. P. 347.
- Sigalov A.B. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. № 640. P. 121–163.
- Graham D.B., Akilesh H.M., Gmyrek G.B., Piccio L., Gilfillan S., Sim J., Belizaire R., Carrero J.A., Wang Y., Blaufuss G.S., et al. // *Blood.* 2010. V. 116. № 17. P. 3208–3218.
- Walport M.J. // *N. Engl. J. Med.* 2001. V. 344. № 14. P. 1058–1066.
- Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tukhvatulin A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med.* 2011. V. 89. № 4. P. 331–341.
- Zhang J., Jex E., Feng T., Sivko G.S., Baillie L.W., Goldman S., van Kampen K.R., Tang D.C. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. № 1. P. 1–8.
- Radjainia M., Hyun J.K., Leysath C.E., Leppla S.H., Mitra A.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 32. P. 14070–14074.

УДК 57.088.1

Разработка иммуноанализа с помощью интерферометрической регистрации его кинетики в реальном времени

А. В. Орлов^{1,2}, А. Г. Буренин^{1,2}, В. О. Шипунова², А. А. Лизунова², Б. Г. Горшков¹,
П. И. Никитин^{1*}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

²Московский физико-технический институт, 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

*E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru

Поступила в редакцию 15.05 2013

РЕФЕРАТ Предложен и экспериментально реализован метод для эффективной разработки и оптимизации протоколов твердофазного иммуноанализа на поверхности стекла за счет высокочувствительного количественного мониторинга каждой стадии анализа. Метод основан на использовании принципа спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ), позволяющего измерять в реальном времени толщину слоя, образующегося в результате связывания биомолекул из раствора с распознающими молекулярными рецепторами на поверхности сенсорного чипа. Реализация предложенного метода выполнена с помощью компактных трехканальных СКИ-биосенсоров, использующих в качестве сенсорных чипов стандартные покровные стекла без нанесения дополнительных пленок. Проведено экспериментальное сравнение различных схем иммобилизации антител на стеклянную поверхность, а также оптимизация таких схем для достижения высокой сорбционной емкости сенсорных чипов. Выполнена сравнительная характеристика кинетики каждого этапа иммуноанализа, проведенного с использованием оптимизированных протоколов: ковалентной иммобилизации антител на эпоксилированную поверхность и сорбции на биотинилированную поверхность с помощью высокоаффинной связи биотин–стрептавидин. На примере детекции сердечного тропонина I показано, что применение магнитных наночастиц в качестве меток приводит к дополнительному усилению сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, что позволяет улучшить предел детекции в 100 раз. Разработанные протоколы могут использоваться в сочетании с альтернативными платформами иммуноанализа, в том числе основанными на регистрации лишь конечного результата – количества связавшихся меток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА безметочные биосенсоры, биотинилирование, иммуноанализ, интерферометрия, магнитные наночастицы, сенсорные чипы, сердечный тропонин I, функционализация поверхности, эпоксилирование поверхности, эффективность иммобилизации биомолекул.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан; БСА – бычий сывороточный альбумин; ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор; ГОТС – (3-глицидоксипропил)триметоксисилан; ДМФА – диметилформамид; сТнI – сердечный тропонин I; МНЧ – магнитные наночастицы; СКИ – спектрально-корреляционная интерферометрия.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире значительное внимание уделяется исследованиям, посвященным методам определения белковых маркеров заболеваний в сложных биологических жидкостях, например крови, сыворотке, слюне и т.п. Разработка методов иммуноанализа для регистрации таких веществ чрезвычайно важна для клинической [1] и экстренной [2] диагностики, контроля эффективности лечения [3], поиска новых специфических антигенов как маркеров заболеваний [4], разработки лекарственных средств [5–7] и др. Одним из распространенных форматов

иммуноанализа [8], обеспечивающих высокую чувствительность, точность и специфичность, является твердофазный сэндвич-иммуноанализ [9, 10]. В его основе лежит образование на твердой фазе комплекса «иммобилизованное антитело–антиген–детектирующее антитело», образующегося только в присутствии определяемого антигена. Результат регистрируется с помощью меток различной природы (ферментных [11], латексных [12], золотых [13], магнитных [14, 15] и пр.), соединенных с детектирующими антителами, как правило, ковалентно или с помощью высокоаффинной промежуточной

связи, например «антитело–антиген» [16], «биотин–стрептавидин» [17], «барназа–барстар» [18, 19].

Основные характеристики иммуноанализа – предел детекции, линейный и динамический диапазон, чувствительность, специфичность – зависят от выбора антител, способа их иммобилизации на твердую фазу, площади поверхности твердой фазы, времени инкубации и концентрации иммунореагентов, а также состава буферных и стабилизирующих растворов [20]. Влияние каждого из этих параметров можно оценить с помощью меточных методов лишь на завершающей стадии иммуноанализа. Безметочные оптические методы могут значительно повысить эффективность разработки протокола иммуноанализа за счет мониторинга в реальном времени всех этапов биохимических реакций, а также сокращения времени и числа операций. Наиболее распространены методы, использующие дорогостоящие сенсорные чипы с прецизионно напыленными пленками золота [21, 22], оптическими диэлектрическими пленками с регламентированным показателем преломления [23], пористыми кремниевыми структурами с фиксированной глубиной пористости [24] и т.д. В результате многие методы оказываются слишком затратными по сравнению с традиционным иммуноферментным анализом для разнообразных применений, требующих одноразовых расходных материалов.

Ранее авторами были предложены оригинальные методы спектрально-фазовой [25, 26] и спектрально-корреляционной интерферометрии [27–29] для регистрации взаимодействия биомолекул на поверхности плоскопараллельных прозрачных пластин, например недорогих пкровных стекол, как без каких-либо покрытий, так и с нанесением тонких пленок, типичных для поверхностных слоев биосенсорных чипов. Эти методы успешно применяются для количественного определения конформационных изменений полимеров [30], регистрации маркеров заболеваний в сыворотке крови [31], пиретроидов при экологическом мониторинге [32], выявления функциональных механизмов лекарственных препаратов [33].

Целью работы была разработка методики оптимизации сэндвич-иммуноанализов с помощью мониторинга в реальном времени каждой стадии анализа методом спектрально-корреляционной интерферометрии. Для демонстрации возможностей методики проведена оптимизация магнитного иммуноанализа [15, 34, 35], использующего в качестве меток магнитные наночастицы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

Комплекс из субъединиц сердечных тропонинов I, T и C, моноклональные антитела к сердечному тропо-

нину I (клоны 19C7 и 16A11), конъюгаты моноклональных антител к сердечному тропонину I (клоны 19C7 и 16A11) с биотином были любезно предоставлены проф. А.Г. Катрухой (группа иммунохимии МГУ, Москва). В работе также использовали (3-аминопропил)триэтоксисилан, (3-глицидоксипропил)триметоксисилан, N-гидроксисукцинимидный эфир биотина (Sigma Aldrich, США); коммерчески доступные наночастицы (Miltenyi Biotec, Германия) размером ~50 нм, состоящие из нескольких кристаллов оксида железа, покрытых полимерной оболочкой, с которой были ковалентно конъюгированы распознающие биомолекулы: стрептавидин или моноклональные крысиные антимышинные антитела к изотипу IgG1. Остальные реагенты имели квалификацию не ниже «ч.д.а.».

Характеризация магнитных наночастиц (МНЧ)

Микрофотографии МНЧ получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 с ускоряющим напряжением 200 кВ.

Метод спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ)

Метод спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ), подробно описанный в [27–29], использует два интерферометра Фабри–Перо в оригинальной оптической схеме с применением излучения суперлюминесцентных диодов. База первого интерферометра (расстояние между зеркалами) периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического преобразователя. Роль второго интерферометра и сенсорного чипа выполняет прозрачная плоскопараллельная пластина, например из стекла или пластика, как без каких-либо пленок, так и с частично прозрачными пленками на поверхности. В данной работе в качестве сенсорного чипа использовали пкровное стекло с иммобилизованными на поверхности рецепторными молекулами. Показано, что такие стекла при толщине около 100 мкм являются приемлемыми интерферометрами Фабри–Перо при условии, что размер каждой отдельной зоны наблюдения составляет 2–8 мм. На таком расстоянии толщина стандартных пкровных стекол варьирует менее чем на четверть длины волны излучения.

Метод СКИ использует интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пкровного стекла, и зондирующим лучом, отраженным от верхней поверхности стекла с биораспознающими молекулами (рис. 1А). В ходе исследуемой биохимической реакции на сенсорном чипе происходит присоединение биомолекул из раствора (лигандов) к рецепторным молекулам, что увеличивает оптический путь зондирующего луча, отраженного от гра-

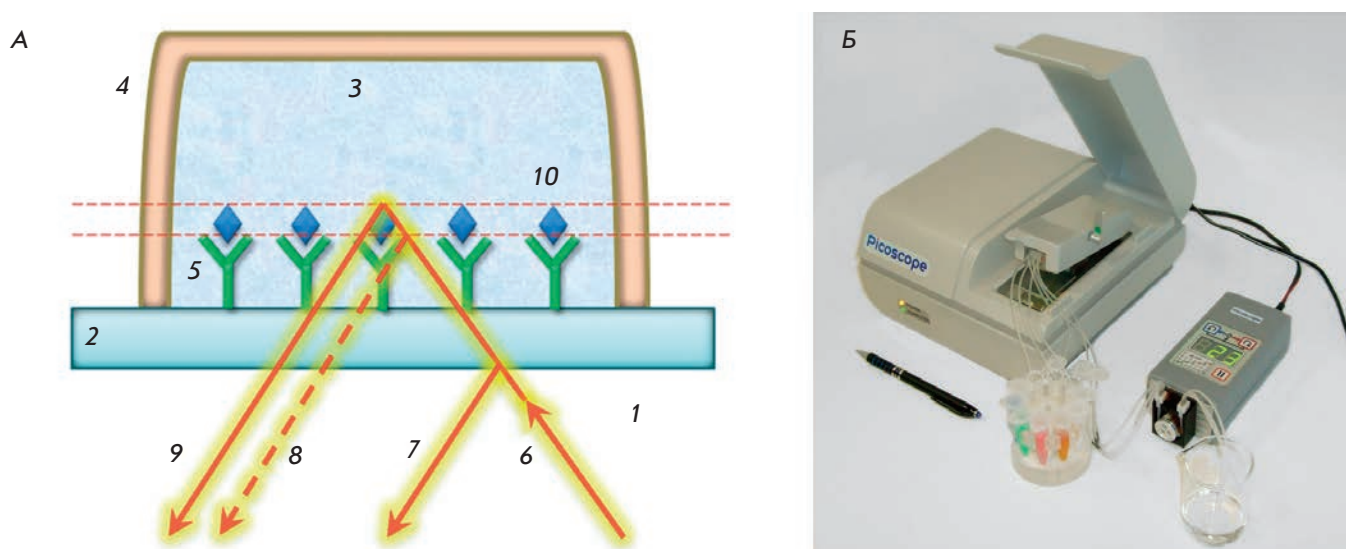


Рис. 1. Принцип СКИ. Изменение оптической толщины биослоя на поверхности стекла регистрируется по спектру интерферирующих лучей, отраженных от сенсорного чипа (А): 1 – воздух; 2 – покровное микроскопное стекло; 3 – исследуемый раствор; 4 – проточный канал; 5 – рецепторные молекулы; 6 – падающий луч излучения суперлюминесцентного светодиода; 7, 9 – отраженные лучи; 8 – положение отраженного луча до биохимической реакции; 10 – регистрируемые биомолекулы. Б – фотография трехканального биосенсорного прибора Пикоскоп®

ницы «жидкость–биослой». Результат интерференции двух лучей зависит от толщины биологического слоя, изменение которой в ходе реакции вычисляется по изменению фазы корреляционного сигнала при сканировании базы первого интерферометра.

Метод СКИ реализован в семействе приборов Пикоскоп® (рис. 1Б), которые позволяют регистрировать в реальном времени динамику молекулярных реакций на поверхности покровных стекол с разрешением по глубине в пикометровом диапазоне толщин, усредненных по области наблюдения [28]. В текущей приборной реализации сенсорный чип размещался внутри прибора и накрывался крышкой, имеющей три независимых канала. Каждый из каналов соединен с проточной системой, обеспечивающей проток реагентов по верхней поверхности стекла. Высота канала 0.1 мм, продольные размеры 3.5×1.7 мм. Реагенты пропускали со скоростью 7.5 мкл/мин при комнатной температуре. Оптическая регистрация в каждом канале осуществлялась по спектру интерферирующих лучей, отраженных от нижней поверхности сенсорного чипа, находящегося в центральной области канала площадью 1 мм^2 . Пикоскоп® позволяет использовать сенсорные чипы с предварительно иммобилизованными антителами [28]. В данной работе процесс иммобилизации проходил непосредственно в протоке внутри прибора с целью количественного мониторинга.

Очистка поверхности стекол

Приведенные ниже химические модификации стеклянной поверхности осуществлялись по методикам, разработанным для определения концентрации сердечного тропонина на основе подходов, обсуждавшихся в [32].

С целью очистки и повышения плотности гидроксильных групп на поверхности покровных стекол промывали метанолом, помещали в 30% раствор пероксида водорода и 95% серной кислоты в соотношении 1 : 3 и инкубировали в течение 40 мин при 70°C . После этого промывали 3 раза тридистиллированной водой и 2 раза метанолом. Стекла после очистки немедленно подвергались последующим химическим модификациям.

Аминирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла получали следующим образом: очищенные стекла помещали в 3% раствор АПТЭС в метаноле и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, 3 раза промывали в изопропанолу и высушивали. Аминированные стекла до момента использования хранили при комнатной температуре.

Для ковалентной иммобилизации смешивали 5 мкл антител (1 мг/мл), 1 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), 2 мг N-гидроксисукцинимид (NHS) и 35 мкл 10 мМ фос-

фатного буфера (рН 5.0), инкубировали в течение 15 мин, затем добавляли 160 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР), рН 7.4, и пропускали полученный раствор по поверхности аминированных стекол в проточной системе биосенсора Пикоскоп® в течение 10 мин.

Эпоксирование стекол и иммобилизация антител

Прошедшие очистку стекла помещали в 5% раствор ГОТС в метаноле и инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре. Промывали 3 раза изопропанолом и выдерживали в сушильном шкафу 1 ч при 105°C. До использования в экспериментах стекла хранили при комнатной температуре. Иммобилизацию антител проводили непосредственно в проточной системе прибора, пропуская по поверхности стекла раствор целевых антител с концентрацией 25 мкг/мл в ФСБР.

Биотинилирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла помещали на 2 ч в раствор, содержащий 10 мМ *N*-гидроксисукцинимидного эфира биотина и 500 мМ триэтиламина в диметилформамиде (ДМФА) при комнатной температуре. После промывки ДМФА и метанолом стекла высушивали и до использования хранили при комнатной температуре. Для иммобилизации антител в проточной системе прибора по поверхности стекла последовательно пропускали растворы стрептавидина в концентрации 25 мкг/мл в ФСБР и целевых биотинилированных антител в такой же концентрации в ФСБР, причем оба процесса контролировались по сенсограмме прироста толщины биомолекул на поверхности.

Карбоксилирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла помещали на 2 ч в раствор, содержащий 15 мМ янтарного ангидрида в ДМФА. После тройной промывки ДМФА стекла высушивали и до использования хранили при комнатной температуре. Затем стекла на 15 мин помещали в смесь 10 мМ EDC и 15 мМ NHS в ДМФА. После промывки ДМФА стекла высушивали. Затем в проточной системе прибора осуществляли сорбцию целевых антител в концентрации 25 мкг/мл в ФСБР и контроль их толщины, усредненной по сенсорной поверхности.

Иммуноанализ на тропонин

По биотинилированной поверхности сенсорного чипа последовательно пропускали следующие растворы иммунореагентов в ФСБР, рН 7.4: 1) стрептавидин – 25 мкг/мл, 2) биотинилированные антитела

(клон 19С7) к тропонину – 25 мкг/мл, 3) комплекс из субъединиц сердечных тропонинов I, T и C с добавлением 100 мкг/мл БСА и 0.01% глицина, 4) вторые антитела (клон 16А11) к тропонину – 25 мкг/мл, 5) магнитные частицы с 0.1% БСА. Между иммунореагентами в течение 3 мин пропускали ФСБР для промывки. Иммуноанализ на аминированной, эпоксилированной и карбоксилированной поверхностях сенсорных чипов проводили аналогично, но вместо этапов 1 и 2 пропускали раствор нативных антител (клон 19С7) к тропонину в концентрации 25 мкг/мл. Предел детекции определяли по критерию 2σ как минимальную концентрацию антигена, при которой детектируемый сигнал превышает сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена, по крайней мере на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля.

Определение наблюдаемой кинетической константы ассоциации

Определение наблюдаемой кинетической константы ассоциации основано на теоретической модели равновесной ассоциации [36], адаптированной к применяемой биосенсорной системе. Значения кинетических констант ассоциации k_a и диссоциации k_d , а также максимального сигнала R_{max} выбирались таким образом, чтобы экспериментально наблюдаемые участки сенсограммы при пропускании аналита в концентрации C наилучшим образом соответствовали аппроксимирующей функции:

$$R_t = Ck_a R_{max} \{1 - \exp[-(Ck_a + k_d)t]\} / (Ck_a + k_d).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объект исследований

В качестве модельного антигена при проведении иммуноанализа был выбран сердечный тропонин I (сТнI) – специфичный маркер инфаркта миокарда [37], который локализуется в сердечной мышце и участвует в регуляции ее сокращения. При повреждении сердечной мышцы тропонин I попадает в кровь [38], и по его содержанию в крови можно отличить острый инфаркт миокарда от заболеваний с аналогичными симптомами. Нормальное содержание данного кардиомаркера в крови здоровых доноров, определенное по 99-му процентилю контрольной группы, несколько отличается у различных производителей тестов и составляет 0.01–0.1 нг/мл [39]. При инфаркте миокарда содержание тропонина начинает повышаться в первые же часы, пиковая концентрация достигается через 24–48 ч и может превышать 1000 нг/мл [40], а через 5–14 дней уровень сТнI возвращается к нормальному [41]. Кроме того,

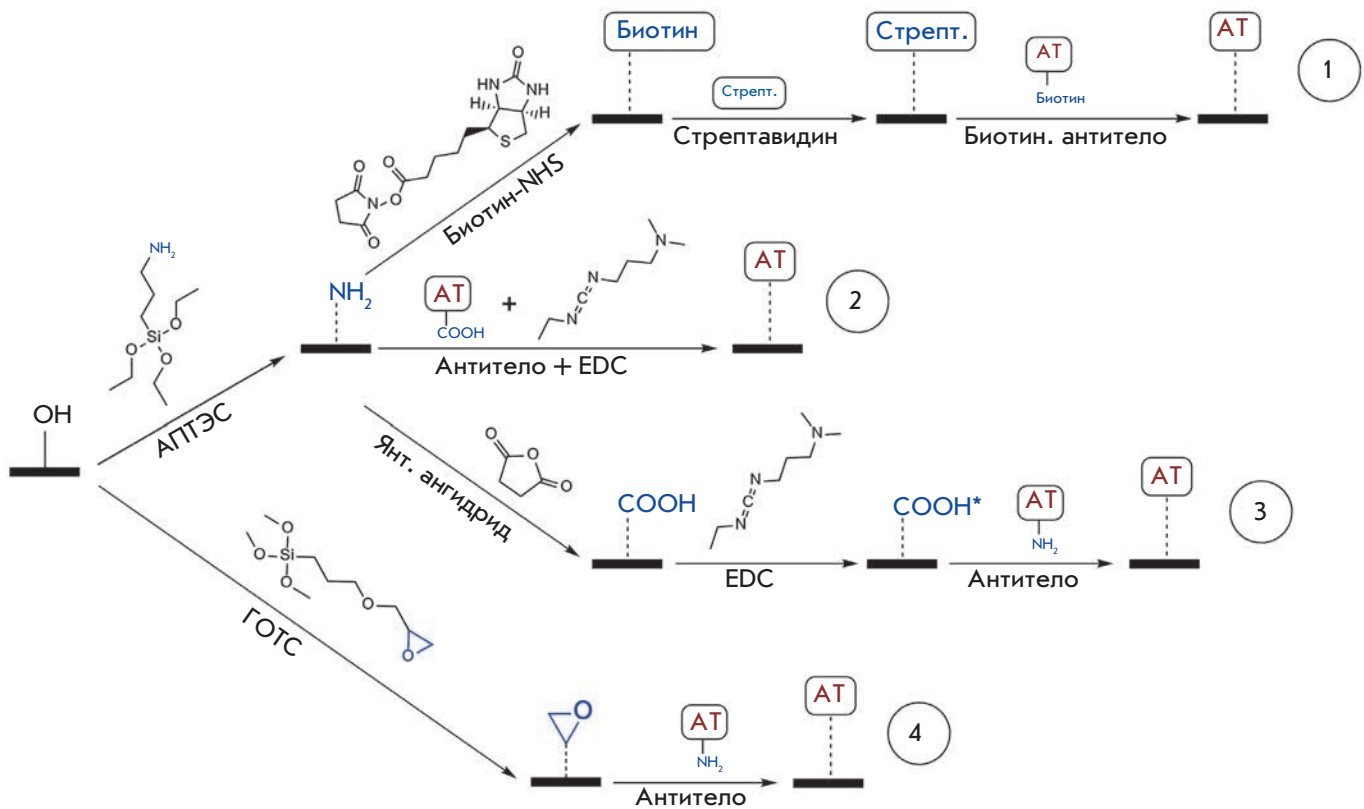


Рис. 2. Схемы иммобилизации антител на стеклянную поверхность: нековалентная сорбция биотинилированных антител на биотинилированную поверхность (1); ковалентная сорбция на аминированную (2), карбоксилированную (3) и эпоксилированную (4) поверхности

по уровню данного маркера можно судить о риске возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у здоровых людей и осложнений в постинфарктный период [42]. В настоящее время разработаны и коммерчески доступны антитела к сТнI, обладающие низкой кросс-реактивностью и высокой специфичностью [43]. На данный момент разработан целый ряд технологий регистрации сТнI [44]. Однако требования к методам детекции данного кардиомаркера крайне высоки, поэтому возникает потребность в новых, более скоростных и чувствительных подходах. В этой связи представляется актуальным создание инструмента для количественного мониторинга в реальном времени всех стадий иммуноанализа, позволяющего ускорить и упростить процедуру разработки новых методов.

Сравнительный анализ различных схем иммобилизации антител

Традиционный метод сэндвич-иммуноанализа состоит из следующих этапов: а) иммобилизация антител на поверхности сенсорного чипа, которая в коммер-

ческих тестах обычно осуществляется предварительно; б) связывание антигена с иммобилизованными антителами; в) распознавание детектирующими антителами другого эпитопа антигена; г) ассоциация меток с детектирующими антителами и детекция меток. Характеристики анализа существенно зависят от поверхностной химии иммобилизации антител на твердую фазу. С помощью биосенсора Пикоскоп® выполнен сравнительный анализ четырех схем функционализации стеклянной поверхности, показанных на рис. 2.

На рис. 3 изображены сенсограммы (зависимости изменения толщины биослоя на сенсорном чипе от времени), полученные на стадии иммобилизации антител для упомянутых схем. Данные сенсограммы позволяют оценить кинетические параметры и интегральную плотность сорбции антител. Видно, что для выбранных условий максимальная скорость иммобилизации и наибольшая плотность сорбции наблюдается при использовании схем 2 и 4, а схема 3 отличается более медленной сорбцией и меньшей плотностью иммобилизации. Данные

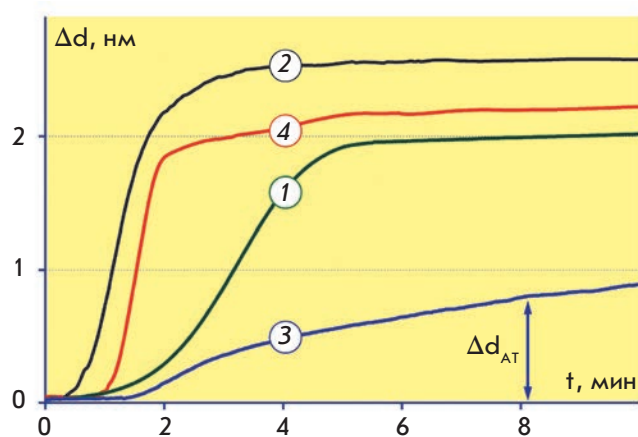


Рис. 3. Сенсограммы при иммобилизации антител на биотинилированную (1), аминированную (2), карбоксилированную (3) и эпоксилированную (4) поверхности

результаты демонстрируют возможность количественного мониторинга в реальном времени процесса иммобилизации антител с помощью предлагаемого подхода. При этом однозначное сравнение выбранных схем выходит за рамки данной работы, поскольку не все условия были предварительно оптимизированы.

Отметим, что интегральная плотность сорбции антител, оцененная по изменению толщины биослоя Δd_{AT} на стадии иммобилизации, может отличаться от плотности биологически активных антител на поверхности твердой фазы, поскольку при сорбции антитела могут терять способность связывать антиген из-за частичной денатурации, стерической недоступности сайтов связывания при неориентированной сорбции и т.д. Так, при использовании схемы 2 может наблюдаться инактивация антител из-за образования перекрестных пептидных связей между различными молекулами после инкубации с карбодимидом. Как показано далее, метод СКИ позволяет количественно оценить потерю активности антител при разных способах иммобилизации путем регистрации связывания с антигеном.

Необходимо отметить, что схемы 2 и 3 требуют предварительной активации карбодимидом поверхности сенсорного чипа или антител. Помимо временных затрат, это может привести к недостаточной воспроизводимости результатов при практическом использовании в условиях, где поддержание стабильности карбодимида затруднено. Из-за эффективности и удобства использования в лабораторных условиях для последующих экспериментов были выбраны схемы 1 и 4.

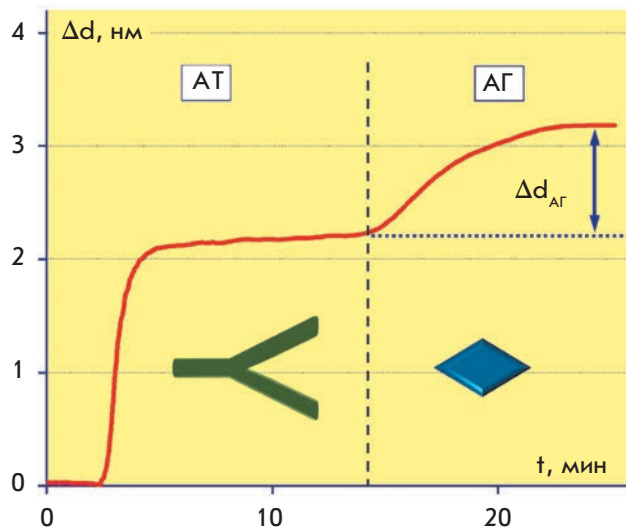


Рис. 4. Сенсограмма безметочной регистрации сердечного тропонина в концентрации 0.5 мкг /мл на эпоксилированной поверхности. Непосредственно перед внесением анализируемого раствора (показано пунктиром) в течение 3 мин с целью промывки пропускали ФСБР

Оптимизация протоколов иммобилизации антител

Оптимизация протоколов иммобилизации антител проводилась для достижения высокой сорбционной емкости сенсорной поверхности, от чего непосредственно зависит чувствительность иммуноанализа. На рис. 4 представлена характерная сенсограмма, демонстрирующая последовательные изменения толщины биослоя, соответствующие иммобилизации антител на эпоксилированной поверхности и связыванию с ними сердечного тропонина из анализируемого раствора, содержащего сТnI в концентрации 0.5 мкг/мл. В течение 3 мин перед внесением анализируемого раствора с целью промывки пропускался ФСБР, что соответствует короткому горизонтальному участку сенсограммы, на котором толщина биослоя практически не менялась.

В качестве критерия оптимизации процесса иммобилизации антител было принято предельное изменение толщины слоя Δd_{AT} , регистрируемое при пропускании раствора антигена в концентрации 1 мкг/мл по поверхности сенсорных чипов, полученных обоими способами. Значение Δd_{AT} пропорционально количеству антигена, связавшегося с антителами, иммобилизованными на поверхности сенсорных чипов, и характеризует плотность биологически активных антител на поверхности твердой фазы – более важному для чувствительности анализа параметру, чем интегральная плотность иммобилизованных антител.

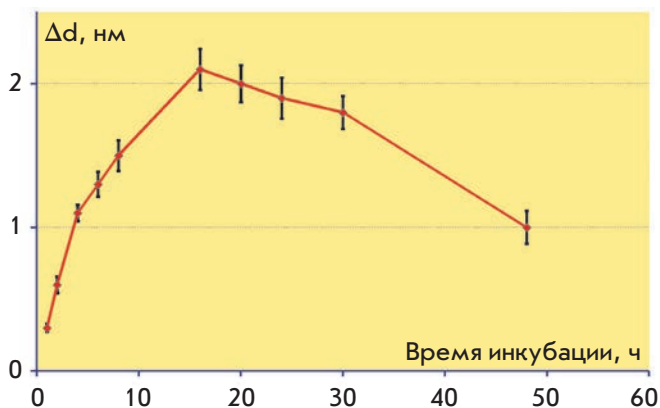


Рис 5. Характерная зависимость сигнала, наблюдаемого при сорбции сердечного тропонина в концентрации 1 мкг/мл на антитела от времени начального эпоксилирования сенсорных чипов в ГОТС при объемной доле воды в растворе 0.1%

Для выбранных схем исследовали зависимость эффективности иммобилизации антител от времени начальной инкубации стекол с модифицирующими поверхность агентами (АПТЭС и ГОТС), а также от объемной доли воды в инкубационном растворе. Последний параметр влияет на соотношение скоростей модификации поверхности, сополимеризации молекул органосиланов в растворе и гидролиза их функциональных групп [45], что определяет эффективность последующей иммобилизации антител: их поверхностную плотность (оптическую толщину) и реакционную способность. Установлено, что максимальный прирост слоя антигена на стадии иммуноанализа достигается при длительности начальной модификации стекол, равной 16 ч, и объемной доле воды – 1% для АПТЭС и 0.1% для ГОТС. В качестве иллюстрации характерная зависимость сигнала от времени инкубации для ГОТС показана на рис. 5. Видно, что максимальная толщина биослоя (и, следовательно, чувствительность биосенсорного анализа) достигается при продолжительности модификации сенсорной поверхности, равной 16 ч. Такое поведение экспериментальной кривой может быть объяснено совместным протеканием двух конкурирующих процессов – иммобилизации органосиланов на поверхность сенсорного чипа и гидролиза эпоксидной группы силана.

Экспериментально показано, что при оптимальных параметрах для эпоксилированной и биотинилированной поверхностей наблюдается практически идентичная плотность иммобилизации антител Δd_{AT} , при том что плотность сорбции антигена c_{TnI} на ан-

титела на эпоксилированной поверхности в ~ 2 раза больше, т.е. в этом случае существенно выше доля активных молекул антител.

Калибровочные кривые в безметочном режиме

Калибровочные кривые в безметочном режиме отражают зависимость детектируемого сигнала Δd_{AG} от концентрации тропонина (рис. 6). При иммобилизации на эпоксилированную и биотинилированную поверхности сенсорных чипов пределы детекции составили соответственно 20 и 30 нг/мл. Различие в пределах детекции при упомянутых схемах иммобилизации антител связано с обсуждавшимся выше экспериментально установленным фактом: плотность иммуоактивных антител на эпоксилированной поверхности в среднем в 2 раза больше. Динамический диапазон составил в обоих случаях около двух порядков величины концентраций, что позволяет регистрировать уровень тропонина вплоть до ~3000 нг/мл. Данный диапазон позволяет определять обширные инфаркты миокарда, но не покрывает всего клинически значимого диапазона в области низких концентраций сердечного тропонина.

Разработанные протоколы иммобилизации антител, а также методы количественной оценки эф-

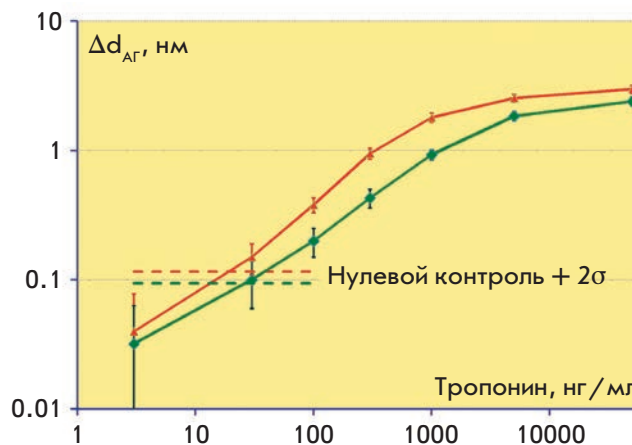


Рис. 6. Калибровочные кривые в логарифмическом масштабе, полученные в безметочном режиме на биотинилированной (нижняя зеленая кривая) и эпоксилированной (верхняя красная кривая) поверхностях сенсорного чипа, отражают зависимость прироста биослоя Δd_{AG} от концентрации сердечного тропонина. Горизонтальные пунктирные линии соответствуют значениям, которые превышают сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля

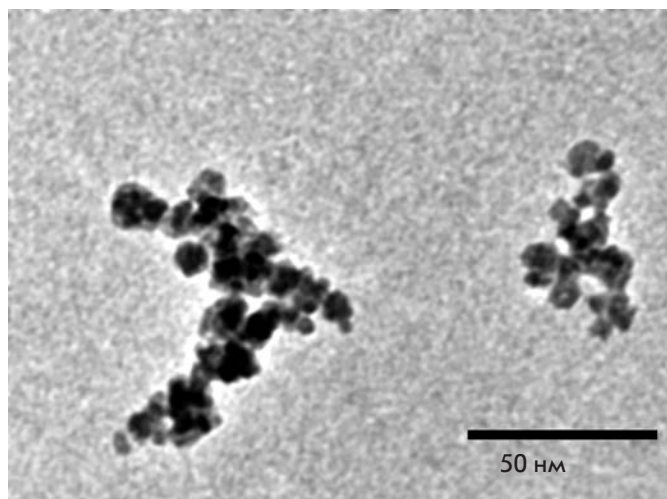


Рис. 7. Микрофотография магнитных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии

фективности иммобилизации могут быть напрямую перенесены на современные биосенсорные платформы, в том числе основанные на детекции окрашенных, ферментных или флуоресцентных меток. Следует отметить, что Пикоскоп® допускает нанесение на покровные стекла широкого набора частично прозрачных пленок (полимерных [30], углеродных и т.д.) или интерфейсных слоев, т.е. регистрировать межмолекулярные взаимодействия как непосредственно на стеклянных, так и на других типах поверхностей, наиболее распространенных в области биосенсорки. Таким образом, возможно упростить разработку широкого спектра различных типов иммуноанализа за счет проведения с помощью Пикоскопа® трудоемких для меточных методов процедур: скрининга антител, выбора буферных растворов, времен инкубаций реагентов и других стадий предварительной оптимизации анализа. Результаты такой оптимизации затем могут использоваться в сочетании с разнообразными методами меточной детекции. Это выгодно отличает метод СКИ от подавляющего большинства других оптических безметочных методов и позволяет использовать его при разработке широкого круга иных биосенсорных систем.

Характеризация и мониторинг в реальном времени связывания магнитных наночастиц

Завершающей стадией иммуноанализа в сэндвич-формате является связывание меток с твердой фазой и их последующая детекция. В данной работе в качестве меток использовались магнитные наночастицы. Применение МНЧ в иммуноанализе позволяет уве-

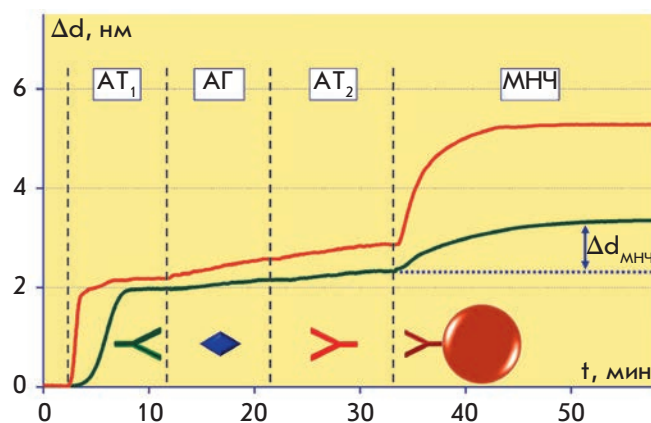


Рис. 8. Сенсограммы, демонстрирующие все шаги магнитного иммуноанализа на биотинилированной (нижняя зеленая кривая) и эпоксилированной (верхняя красная кривая) поверхностях сенсорного чипа: АТ₁ – иммобилизация антител, АГ – связывание антигена (100 нг/мл сТнI) с иммобилизованными антителами, АТ₂ – распознавание детектирующими антителами другого эпитопа антигена, МНЧ – ассоциация магнитных наночастиц с детектирующими антителами. Промывки ФСБР проводились в течение 3 мин перед каждым шагом, указанным пунктиром

личить скорость и чувствительность анализа, проводить детекцию в сложных средах и анализировать пробы большого объема [35]. Полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа типичная микрофотография МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, представлена на рис. 7. Из рис. 7 видно, что частицы представляют собой неоднородные по размеру кластеры, состоящие из нескольких наночастиц диаметром ~10 нм, что согласуется и с результатами ряда других исследований подобных частиц [46]. Такие частицы, тем не менее, демонстрируют низкое неспецифическое связывание с компонентами сложных биологических сред, таких, как цельная кровь [47], и обеспечивают высокую воспроизводимость результатов в иммуноанализе при их использовании в качестве детектируемой метки [35].

На рис. 8 показаны сенсограммы, полученные для чипов с эпоксилированной (верхняя кривая) и биотинилированной (нижняя кривая) поверхностями, которые демонстрируют все этапы магнитного сэндвич-иммуноанализа при детекции 100 нг/мл раствора сТнI. Непосредственно перед внесением каждого иммуореагента с целью промывки пропускался ФСБР, что соответствует коротким горизонтальным участкам сенсограммы, на которых толщина биослоя практически не менялась. Для анализа на чипе

Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации для каждого этапа магнитного иммуноанализа в зависимости от типа поверхности

Тип поверхности	Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации, $M^{-1}s^{-1}$		
	Этап АГ	Этап АТ ₂	Этап МНЧ
Эпоксидированная	$(6.4 \pm 1.3) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^8$
Биотинилированная	$(8.2 \pm 1.9) \times 10^5$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^5$	$(6.4 \pm 1.1) \times 10^7$

с эпоксидированной поверхностью использовались ковалентно иммобилизованные нативные антитела АТ₁, биотинилированные детектирующие антитела АТ₂ и МНЧ, покрытые стрептавидином. Использование таких магнитных частиц в сочетании с сенсорными чипами с биотинилированной поверхностью привело бы к высоким неспецифическим сигналам из-за непосредственного связывания частиц со свободными молекулами биотина. В связи с этим на биотинилированных чипах через стрептавидин иммобилизовывались антитела АТ₁ изотипа IgG2b, в качестве детектирующих применялись антитела АТ₂ изотипа IgG1, а также другой тип магнитных частиц, специфично распознающих этот изотип антител АТ₂.

В сенсограммах, полученных на разных поверхностях при одинаковой концентрации антигена, отличия, проявляющиеся на этапах АГ и АТ₂, становятся еще более существенными на этапе МНЧ. Как видно из рис. 8, скорость связывания МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, выше скорости связывания МНЧ, на поверхности которых находятся антитела к изотипу детектирующих антител. Это связано, во-первых, с различной эффективностью сорбции антител на сенсорный чип. Во-вторых, кинетическая константа ассоциации стрептавидаина с биотином на несколько порядков выше, чем у моноклональных антител с антигеном. Это обеспечивает более сильное и быстрое связывание МНЧ, покрытых стрептавидином, по сравнению с МНЧ, покрытыми антителами.

Полученные результаты позволяют оценивать кинетические характеристики взаимодействия биомолекул не только между собой, но и с магнитными частицами. В таблице приведены наблюдаемые кинетические константы ассоциации, оцененные для каждого этапа анализа при помощи сенсограмм, регистрируемых Пикоскопом®. Для обеих схем иммобилизации антител на этапе МНЧ наблюдаемые кинетические константы ассоциации на 2–3 порядка превышают регистрируемые на предыдущих этапах, несмотря на то, что на каждом следующем шаге анализа этот параметр меньше истинного значения из-за диссоциации комплексов, образованных на предыду-

щем шаге. Столь хорошие кинетические характеристики связывания МНЧ по сравнению с молекулами антител и антигенов могут объясняться поливалентностью МНЧ. Несколько биораспознающих молекул, одновременно связанных с одной частицей, могут обеспечивать более высокую вероятность эффективного соударения МНЧ с поверхностью сенсорного чипа.

На рис. 9 представлены зависимости прироста $\Delta d_{\text{МНЧ}}$ биослоя на этапе пропускания магнитных наночастиц от концентрации тропонина. Предел детекции на эпоксидированной поверхности, определенный по критерию 2σ , составил 0.1 нг/мл, что в 10 раз лучше значения 1 нг/мл, полученного на биотини-

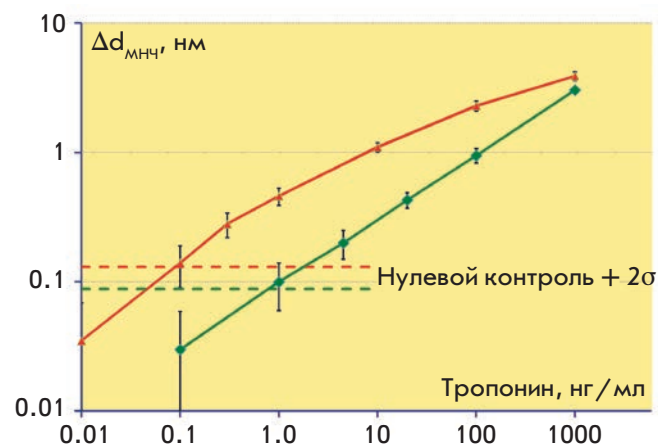


Рис. 9. Калибровочные кривые в логарифмическом масштабе, полученные при регистрации сердечного тропонина на этапе пропускания магнитных наночастиц на биотинилированной (зеленая кривая) и эпоксидированной (красная кривая) поверхностях сенсорного чипа. Горизонтальные пунктирные линии соответствуют значениям, которые превышают сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля

лированной поверхности. Динамический диапазон в обоих случаях составил около трех порядков величины концентрации. Таким образом, использование МНЧ дает результирующее улучшение предела детекции по сравнению с безметочной детекцией более чем в 100 раз, т.е. реализуется многократная амплификация сигнала. Существенно больший прирост толщины биослоя $\Delta d_{\text{МНЧ}}$ на этапе пропускания магнитных частиц по сравнению с этапами связывания антигена и детектирующих антител во всем диапазоне измеряемых концентраций сТнI объясняется тем, что диаметр частиц существенно больше характерных размеров детектируемых биомолекул. Достигнутый предел детекции сердечного тропонина на уровне 0.1 нг/мл соответствует клинически значимому порогу, необходимому для диагностики инфаркта миокарда [48]. Благодаря высокой чувствительности и широкому динамическому диапазону, разработанный биосенсор можно рассматривать в качестве привлекательного инструмента с доступными расходными материалами (одноразовыми сенсорными чипами) для проведения иммуноанализа в реальном времени в таких областях, как диагностика заболеваний, регистрация патогенов в продуктах питания, мониторинг окружающей среды. Дальнейшие исследования будут посвящены оценке эффективности выявления сТнI в реальных биопробах и подтверждению корреляции получаемых результатов с данными традиционных методов.

Помимо диагностической значимости разработанного метода иммуноанализа, достигнутой благодаря усилению СКИ-сигнала, полученные результаты могут представлять особый интерес для изучения и кинетической характеристики взаимодействия наночастиц с молекулами. Отметим, что в настоящее время наиболее распространенными безметочными биосенсорами, позволяющими определять кинетические параметры наночастиц, являются системы на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [21, 36]. Такие биосенсоры позволяют изучать взаимодействие частиц с биомолекулами, иммобилизованными на модифицированной поверхности хорошо проводящих пленок золота или серебра. При этом используется интерфейсная поверхностная химия, значительно отличающаяся от применяемой в наиболее массовых методах твердофазного иммуноанализа, что затрудняет перенос на другие платформы результатов, полученных с помощью ППР-биосенсоров. Применение же СКИ-метода и дешевых расходных сенсорных чипов существенно расширяет исследовательские возможности для разработки разнообразных способов иммуноанализа. Предложенные в настоящей работе методы оптимизации иммуноанализа позволяют перенести все протоколы на маркерные

биосенсорные платформы, например, использующие высокочувствительные методы детекции МНЧ с помощью компактных электронных устройств [15], основанных на смешении частот [49] при нелинейном перемагничивании частиц [34].

Отдельного исследования заслуживает зависимость эффективности амплификации сигналов от размера МНЧ. С одной стороны, магнитные частицы большего размера (вплоть до нескольких микрометров) могут сильнее увеличить сигнал. Однако более крупные частицы подвержены седиментации под действием силы тяжести, что вызовет появление высокого неспецифического сигнала. В данной работе при использовании МНЧ размером 50 нм не было обнаружено седиментации и неспецифического взаимодействия частиц с поверхностью, поэтому использование более мелких наночастиц не целесообразно.

Отсутствие неспецифической сорбции при амплификации сигнала открывает возможности дальнейшего увеличения чувствительности за счет нескольких шагов амплификации. Так, если после МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, пропустить биотинилированный белок с несколькими сайтами биотинилирования, а затем снова частицы, и повторить эту процедуру несколько раз, то возможно значительное увеличение количества меток, а значит, и чувствительности.

Помимо низкого неспецифического связывания МНЧ обладают уникальными свойствами, которые могут быть использованы при дальнейшем развитии предложенных методик. Так, сочетание магнитных свойств с возможностью оптической детекции позволяет реализовать оптомагнитный иммуноанализ [50]. При таком анализе с помощью магнитных частиц можно значительно увеличивать скорость иммунохимических реакций путем магнитного перемешивания, вращения цепочек МНЧ магнитным полем, осуществлять обогащение пробы антигеном за счет магнитной сепарации и снижать неспецифическое связывание меток с поверхностью посредством удаления слабосвязанных частиц магнитным полем соответствующей пространственной конфигурации для «магнитной» отмывки меток.

ВЫВОДЫ

Разработан метод оптимизации магнитного иммуноанализа на стеклянной поверхности, позволяющий регистрировать каждую стадию анализа в реальном времени и использовать в качестве расходных сенсорных чипов недорогие покровные стекла без нанесения каких-либо пленок. Испытаны четыре схемы иммобилизации антител, проведена их оптимизация, оценена эффективность, в результате чего достигнуты высокие значения сорбционной емкости и доли ак-

тивных антител на поверхности сенсорного чипа. Показана возможность регистрации в реальном времени кинетики взаимодействия магнитных наночастиц с биомолекулами. Продемонстрировано, что использование магнитных наночастиц вызывает амплификацию сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, что приводит к дополнительному улучшению предела детекции сердечного тропонина более чем в 100 раз. Таким образом, разработанные интерферометрические биосенсорные системы могут рассматриваться как эффективные инструменты для проведения анализа, а также для широкого круга приложений в таких областях, как разработка и оптимизация методов иммуноанализа, оценка качества иммунореагентов, контроль сорбционных свойств поверхности. Полученные результаты по выбору схемы и оптимизации протоколов иммобилизации антител, мониторингу в реальном времени всех этапов иммуноанализа, кинетической характеристики наночастиц могут быть напрямую перенесены на другие биосенсорные платформы, в том числе с использованием различных меток – магнитных, флуоресцентных, ферментных и др. Развита биосенсорная методика представляется экономич-

чески оправданной альтернативой для проведения иммуноанализа с однократно используемыми расходными материалами для диагностики заболеваний, регистрации патогенов в продуктах питания и мониторинга окружающей среды. ●

Авторы благодарят проф. А.Г. Катруху из МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва) за предоставленные иммунореагенты.

Работа поддержана РФФИ (гранты №10-02-01185, 11-02-01440, 11-04-12181-офи-м 2011, 13-02-01260, 13-03-12468). Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (государственный контракт №16.512.11.2124) с привлечением оборудования Центра коллективного пользования уникальным оборудованием в области нанотехнологий МФТИ (ЦКП МФТИ) при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vaidya V.S., Bonventre J.V. Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 640 p.
- Yanga Zh., Zhou D.M. // Clin. Biochem. 2006. V. 39. № 8. P. 771–780.
- Mayeux R. // NeuroRx. 2004. V. 1. № 2. P. 182–188.
- Lundblad R.L. Development and Application of Biomarkers. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011. 297 p.
- Frank R., Hargreaves R. // Nat. Rev. Drug. Discov. 2003. V. 2. P. 566–580.
- Lee J.M., Han J.J., Altwirger G., Kohn E.C. // J. Proteomics. 2011. V. 74. № 12. P. 2632–2641.
- Bleavins M.R., Carini C., Jurima-Romet M., Rahbari R. Biomarkers in Drug Development: A Handbook of Practice, Application, and Strategy. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 760 p.
- Yalow R.S., Berson S.A. // Nature. 1959. V. 184. P. 1648–1649.
- Uotila M., Ruoslathi E., Envall E. // J. Immunol. Meth. 1981. V. 42. P. 11–15.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. / Проблемы аналитической химии. Биохимические методы анализа // Под ред. Дзантиева Б.Б. М.: Наука, 2010. Т. 12. С. 297–326.
- Engvall E., Perlmann P. // Immunochemistry. 1971. V. 8. P. 871–874.
- Plotz C.M., Singer J.M. // Am. J. Med. 1956. V. 21. № 6. P. 888–892.
- Leuvering J.H.W., Thal P.J.H.M., van der Waart M., Shuurs A.H.W.M. // J. Immunol. Meth. 1981. V. 45. P. 183–194.
- Laborde R., O'Farrell B. // IVD Technology. 2002. April issue. P. 36.
- Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I. // Sens. Lett. 2007. V. 5. № 1. P. 296–299.
- Rosi N.L., Mirkin C.A. // Chem. Rev. 2005. V. 105. № 4. P. 1547–1562.
- Lei J., Ju. H. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2122–2134.
- Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // ACS Nano. 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- David W. The Immunoassay Handbook. Oxford: Elsevier Ltd., 2005. P. 103–135.
- Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. // Biosens. Bioelectron. 1995. V. 10. № 8. P. I–IX.
- Cunningham B.T. Label-free optical biosensors: An introduction. In: Cooper M.A. Label-Free Biosensors: Techniques and Applications. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. P. 1–28.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. // Sens. Act. B. 1993. V. 11. P. 21–27.
- Dancil K.S., Greiner D.P., Sailor M.J. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 7925–7930.
- Никитин П.И., Горшков Б.Г., Валейко М.В., Погов С.И. // Квантовая электроника. 2000. Т. 30. № 12. С. 1099–1104.
- Nikitin P., Gorshkov B., Valeiko M., Nikitin S. // Proc. SPIE. 2001. V. 4578. P. 126–135.
- Nikitin P.I., Valeiko M.V., Gorshkov B.G. // Sens. Act. B. 2003. V. 90. P. 46–51.
- Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. // Sens. Act. B. 2005. V. 111–112. P. 500–504.
- Nikitin P.I., Svetoch I.E., Nikitin M.P., Ksenevich T.I., Gorshkov B.G., Konov V.I., Aksinin V.I. // Proc. SPIE. 2007. V. 6733. P. 67331M.
- Ivanov A.E., Solodukhina N., Wahlgren M., Nilsson L., Vikhrov A.A., Nikitin M.P., Orlov A.V., Nikitin P.I., Kuzimenkova M.V., Zubov V.P. // Macromol. Biosci. 2011. V. 11. № 2. P. 275–284.
- Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И. // Труды МФТИ. 2012. Т. 4. № 3. С. 11–17.

32. Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Ксеневи́ч Т.И., Никитин П.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 3. С. 312–318.
33. Arefieva T.I., Krasnikova T.L., Potekhina A.V., Ruleva N.U., Nikitin P.I., Ksenevich T.I., Gorshkov B.G., Sidorova M.V., Beshpalova Zh.D., Kukhtina N.B., Provatorov S.I., Noeva E.A., Chazov E.I. // *Inflammation Res.* 2011. V. 60. № 10. P. 955–964.
34. Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I. // *J. Magn. Magn. Mater.* 2007. V. 311. P. 445–449.
35. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 2. P. 1154–1163.
36. Appendix C. Predefined models. In: *BIAevaluation 3.0 Software Handbook*. Biacore AB, 1997. P. C-2–C-33.
37. Adams J.E., Bodor G.S., Davila-Roman V.G., Delmez J.A., Apple F.S., Ladenson J.H., Jaffe A.S. // *Circulation.* 1993. V. 88. № 1. P. 101–106.
38. Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Esakova T.V., Pettersson K., Lovgren T., Severina M.E., Pulkki K., Vuopio-Pulkki L.M., Gusev N.B. // *Clin. Chem.* 1997. V. 43. № 8. P. 1379–1385.
39. Thygesen K., Mair J., Giannitsis E., Mueller C., Lindahl B., Blankenberg S., Huber K., Plebani M., Biasucci L.M., Tubaro M., et al. // *Eur. Heart J.* 2012. V. 33. № 18. P. 2252–2257.
40. Peri G., Inrona M., Corradi D., Iacuiti G., Signorini S., Avanzini F., Pizzetti F., Maggioni A.P., Moccetti T., Metra M., et al. // *Circulation.* 2000. V. 102. P. 636–641.
41. NICE clinical guideline 95. Chest pain of recent onset. Assessment and diagnosis of recent onset chest pain or discomfort of suspected cardiac origin. 2010.
42. Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L., Newby L.K., Ravkilde J., Sorrow A.B., Wu A.H.B., Christenson R.H. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 552–574.
43. Katrukha A.G. Antibody selection strategies in cardiac troponin assays. In: Wu A.H.B. *Cardiac Markers*. 2nd Ed. New York: Humana Press, 2003. P. 137–185.
44. Lemos J.A. // *JAMA.* 2013. V. 309. № 21. P. 2262–2269.
45. Silane Coupling Agents. Chapter 13. In: Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*. 2nd Ed. London: Acad. Press, 2008. P. 565–567.
46. Schreiber S., Savla M., Pelekhov D.V., Iscru D.F., Selcu C., Hammel P.C., Agarwal G. // *Small.* 2008. V. 4. № 2. P. 270–278.
47. Martin V.M., Siewert C., Scharl A., Harms T., Heinze R., Ohl S., Radbruch A., Miltenyi S., Schmitz J. // *Exp. Hematol.* 1998. V. 26. P. 252–264.
48. Bingisser R., Cairns C., Christ M., Hausfater P., Lindahl B., Mair J., Panteghini M., Price C., Venge P. // *Am. J. Emergency Med.* 2012. V. 30. P. 1639–1649.
49. Григоренко А.Н., Никитин П.И., Рощепкин Г.В. // *ЖЭТФ.* 1997. Т. 112. № 8. С. 628–642.
50. Nikitin P., Ksenevich T., Nikitin M., Gorshkov B. // *Proceedings of Ninth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPT(R)ODE IX.* Dublin, 2008. P. OA4.2.

УДК 576.535

Композитные матриксы на основе фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины и культивирования клеток в трехмерной культуре

М. М. Мойсенович¹, А. Ю. Архипова¹, А. А. Орлова¹, М. С. Друзцкая¹, С. В. Волкова¹, С. Е. Захаров¹, И. И. Агапов^{2**}, М. П. Кирпичников^{1#}

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава РФ, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

Авторы, внесшие одинаковый вклад в работу (расположены в алфавитном порядке).

*E-mail: igor_agapov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2013

РЕФЕРАТ Трехмерные матриксы на основе регенерированного фиброина шелка были модифицированы компонентом костной ткани – наногидроксиапатитом и/или производным коллагена – желатином. Модификация одним из этих компонентов приводила к усилению адгезии и пролиферации эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) на поверхности матриксов. При этом адгезия и пролиферация МЭФ на поверхности матрикса, содержащего одновременно две композитные добавки, достоверно выше, чем в присутствии одной из композитных добавок. Полученные композитные матриксы могут использоваться для ускорения заживления ран, регенерации костной и других тканей, создания биоискусственных органов. Кроме того, они пригодны для создания модельных систем, предназначенных для изучения *in vitro* взаимодействия клеток с субстратом, миграции клеток и других процессов, полноценное изучение которых в двумерных клеточных модельных системах невозможно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адгезия, гидроксиапатит, желатин, композитные биodeградируемые матриксы, пролиферация, фиброин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; RGD – трипептид Arg, Gly, Asp, участвующий в адгезии клеток; ГА – гидроксиапатит; КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и совершенствование способов восстановления поврежденных или утраченных органов и фрагментов тканей, создание биоискусственных органов – важнейшие задачи современной тканевой инженерии и регенеративной медицины. Технологические прорывы в этих областях возможны при использовании биоматериалов, способных поддерживать адгезию и пролиферацию клеток, обладающих низкой иммуногенностью и со временем деградирующих до химических производных, не наносящих вред организму. Примерами таких современных материалов могут быть бактериальные полиоксикалканаты [1]. Существенным преимуще-

ством данных полимеров являются их уникальные механические свойства, пластичность, способность выдерживать обработку экструзионными методами. Из бактериальных полиоксикалканатов возможно изготовление изделий сложной формы, что делает эту группу материалов перспективными в развитии 3D-прототипирования. Эти материалы уступают в таком показателе, как биосовместимость, коллагену и другим компонентам внеклеточного матрикса. При этом сам коллаген имеет существенные ограничения в использовании из-за своих механических свойств. Изделия из фиброина шелка обладают хорошими показателями биосовместимости в сочетании с высокой механической прочностью и эла-

стичностью. Другие важные преимущества шелка: доступность, возможность получения водных растворов, способность к биологическому разложению с образованием аминокислот, термостабильность, наличие легкодоступных химических групп для функциональных модификаций, устойчивость к радиации, возможность газовой стерилизации, а также приготовления композитных материалов [2, 3]. Увеличивается число публикаций и ссылок на работы, посвященные использованию фиброина для регенерации различных органов и тканей: сухожилий, связок, хрящей, костной ткани, кожи, печени, трахеи, нервов, роговицы, барабанной перепонки, мочевого пузыря, что указывает на высокий потенциал данного полимера в качестве биомедицинского материала [4].

Ранее мы сравнили свойства матриксов из фиброина и из рекомбинантного спидроина. Эти исследования показали, что регенерированный фиброин поддерживает адгезию и пролиферацию фибробластов, одного из основных компонентов, вовлеченных в процессы заживления ран и регенерации тканей, существенно хуже, чем субстрат, сформированный полимеризованным рекомбинантным спидроином из *Nephila clavipes*. Возможно, именно из-за пониженной способности поддерживать адгезию клеток и их пролиферацию регенеративная способность фиброиновых матриксов в экспериментах с искусственным повреждением кости у животных была существенно хуже, чем у спидроиновых. Регенеративные свойства фиброиновых матриксов в подобных опытах удалось существенно улучшить за счет их минерализации наногидроксиапатитом [5]. В нашей работе с целью повышения способности поддерживать адгезию и пролиферацию фибробластов в состав фиброиновых матриксов одновременно ввели две композитные добавки – компонент костной ткани наногидроксиапатит и производное коллагена – желатин. Показано, что композитный субстрат, сформированный всеми тремя компонентами, оптимален для поддержания адгезии и пролиферации МЭФ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кокконы тутового шелкопряда *Bombyx mori* были предоставлены директором Республиканской научно-исследовательской станции шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук В.В. Богословским (Ставропольский край, г. Железноводск). Для получения чистого фиброина шелк из коконов подвергали очистке методом «десерицинизации». Серицин и другие примеси из коконов удаляли кипячением в течение 1.5 ч в 0.03 М растворе NaHCO_3 (рН 8.4), промывали водой и высушивали. Гидрок-

сиапатит природного происхождения предоставлен проф. В.В. Гузеевым (Северский технологический институт, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»).

Изготовление матриксов

Для получения матриксов навеску фиброина (250 мг) растворяли в 1000 мкл 10% раствора хлористого лития в 90% муравьиной кислоте в течение 30 мин при температуре 60–70°C. При изготовлении композитных матриксов с 10% содержанием желатина использовали смесь из 225 мг фиброина и 25 мг желатина в 1000 мкл раствора. Полученный раствор центрифугировали в течение 5 мин при 12100g, супернатант использовали для формирования матриксов. 50 мкл подогретого супернатанта послойно помещали в форму, смешивая со 100 мг хлорида натрия, варьируя размер частиц. В качестве поробразующего агента использовали кристаллы NaCl диаметром 150–300 мкм. Для изготовления композитных матриксов с 30% содержанием ГА навеску порошкообразного ГА смешивали с поробразующими частицами хлорида натрия диаметром 150–300 мкм. Концентрацию частиц соли подбирали таким образом, чтобы получить матрикс со сложной внутренней пористой поверхностью, не содержащей изолированных полостей. Полученные образцы высушивали в течение 3 ч при температуре 75–80°C, далее выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Полученные матриксы в течение 120 мин обрабатывали 96% этанолом, отмывали бидистиллированной водой (120 мин), дегазировали и хранили в 70% этаноле.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Структуру матриксов изучали с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Образцы для электронной микроскопии подготавливали стандартным методом, включающим фиксацию глутаровым альдегидом, обезвоживание возрастающими концентрациями этанола и ацетона. Далее препараты высушивали методом перехода критической точки в приборе HCP-2 critical point dryer (Hitachi Ltd., Япония). Образцы напыляли слоем золота толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0.1 мм рт. ст. на приборе Ion Coater IB-3 (Eiko Engineering, Мито, Япония). Для сканирующей электронной микроскопии использовали Camscan S2 (Cambridge Instruments, Кембридж, Великобритания) в режиме SEI. Разрешение микроскопа 10 нм, рабочее напряжение 20 кВ. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture (SMA, РФ).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Использовали конфокальную лазерную сканирующую систему производства «Никон Корпорейшн» (Япония) – микроскоп медико-биологический инвертированный для лабораторных исследований Eclipse с конфокальным модулем A1. Для достижения высокого разрешения изображений получали серии оптических срезов с установленным согласно рекомендациям производителей размером пинхола (pinhole), лазеров и анализирующих фильтров.

Получение первичной культуры эмбриональных фибробластов мыши, экспрессирующих GFP

Клетки МЭФ получали из эмбрионов GFP+ на 13.5 день внутриутробного развития. Для получения датированной беременности двух самок линии C57Bl/6 подсаживали к самцу GFP+ на ночь, утром у самок проверяли наличие копулятивной пробки. Момент обнаружения копулятивной пробки считали 0.5-м днем беременности. На 13.5 день беременности мышью эвтаназировали, извлекали матку, у эмбрионов удаляли голову и внутренние органы, определяли в них экспрессию GFP на УФ-трансиллюминаторе. Оставшиеся ткани измельчали глазными ножницами в стерильных условиях, диссоциировали в 0.05% растворе трипсин/EDTA и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, а затем клеточную суспензию переносили во флакон площадью 25 см² для адгезивных культур (Grenier). Далее клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 4.5 г/л глюкозы (HyClone) и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), при 37°C в условиях 5% CO₂ и 95% влажности. Каждые 3 дня при достижении 80–85% монослая клетки рассеивали в соотношении 1 : 3.

Самки линии C57Bl/6 получены из питомника для лабораторных животных «Пушино» (ФИБХ РАН), трансгенные самцы с экспрессией GFP любезно предоставлены Н.Н. Логуновой (ЦНИИТ РАМН).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы создали матрицы из фиброина шелка [6], а также матрицы на основе фиброина шелка и ГА [5], и изучили биологические свойства экспериментальных образцов. Матрицы являются биосовместимыми, механически прочными, пористыми и обладают всеми необходимыми свойствами для применения в костной хирургии. В результате данной работы получены матрицы на основе фиброина шелка, композитные матрицы на основе фиброина шелка и желатина, на основе фиброина шелка и ГА, а также композитные матрицы, содержащие три основных компонента: фиброин шелка, желатин и ГА (рис. 1). Для создания этих матриц

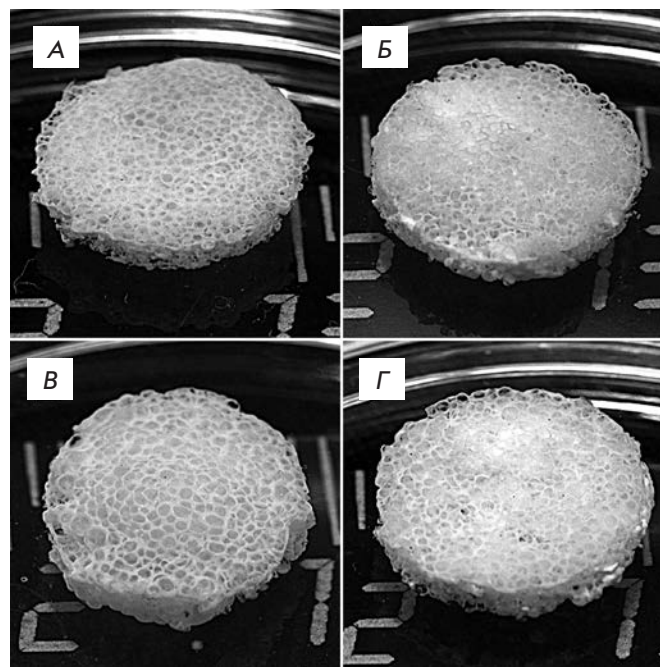


Рис. 1. Внешний вид трехмерных пористых матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), фиброина шелка и гидроксиапатита (В), фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита (Г). Введение в структуру матрикса желатина и гидроксиапатита не приводит к изменениям его внешнего вида

был выбран порообразующий агент с заданным диаметром частиц.

Полученные экспериментальные образцы поддерживали свою целостность, принимали заданную цилиндрическую форму и не разрушались. Композитные матрицы на основе фиброина шелка и желатина упруго деформировались при непосредственном механическом нажатии, на основе фиброина шелка и ГА – не деформировались. Диаметр пор матриц, изготовленных методом выщелачивания, соответствовал внесенным частицам порообразователя (150–300 мкм).

Поверхность изделий изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 2). Полученные матрицы имели ячеистую сетчатую структуру. Порообразователь полностью вымывался из структуры матрикса, какие-либо его остатки нигде не были обнаружены (рис. 2, 3). Соединенность пор матрикса была подтверждена тестом на проницаемость трехмерных конструкций для суспендированных окрашенных частиц туши.

Изучение структуры образцов показало, что количество желатина и ГА, внесенного в составе ком-

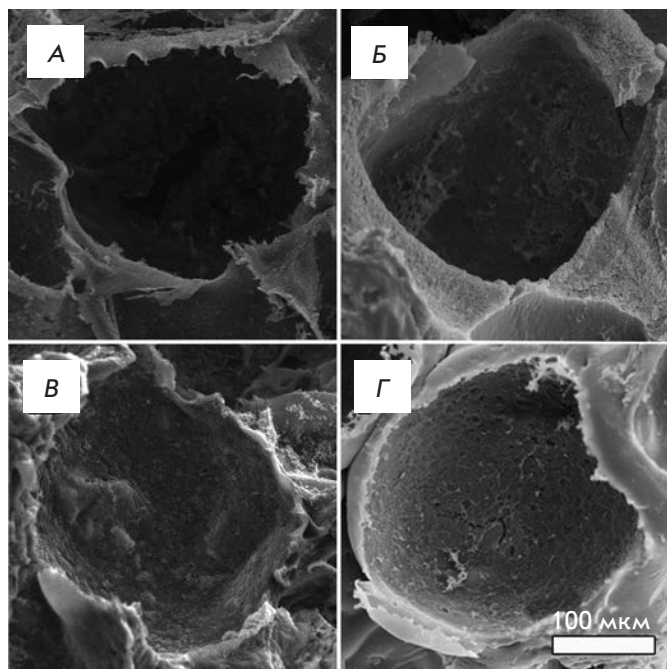


Рис. 2. Структура трехмерных пористых матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), гидроксиапатита (В), желатина и гидроксиапатита (Г). Изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Введение в структуру матрикса желатина и гидроксиапатита не приводит к изменениям размера пор и общей структуры матриц

позитного матрикса, не влияет на соединенность пор, внешний вид изделий, проницаемость для окрашенных частиц туши. Пористость и внешний вид трех опытных образцов матриц были абсолютно идентичны. Это связано с тем, что пористость определяется свойствами порообразователя, который формирует поры диаметром 150–300 мкм, и не зависит от количества добавленного желатина и ГА.

Диаметр пор обуславливает механические свойства конструкции, скорость биодеградации, взаимодействие клеток с поверхностью матрикса, а также влияет на тканевый ответ после имплантации. Большой размер пор способствует лучшему и более быстрому врастанию новообразованной ткани, ее васкуляризации и более эффективной биорезорбции имплантата.

Незамкнутая структура матрикса необходима для трехмерного культивирования клеток. Поры, соединенные отверстиями и каналами, образуют сложную незамкнутую внутреннюю поверхность, способствующую миграции клеток во внутренние слои искусственного матрикса. Незамкнутое строе-

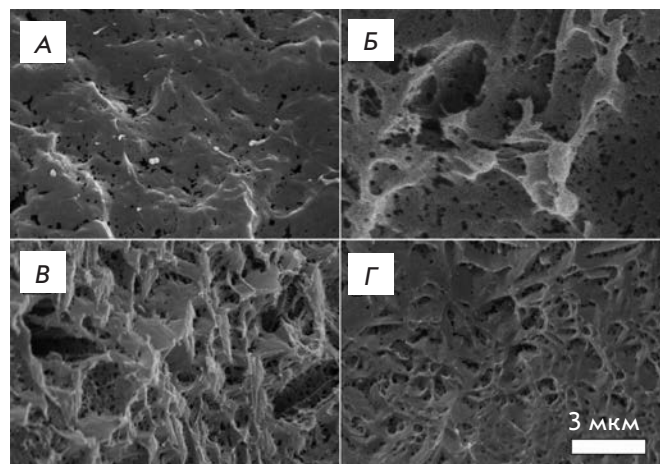


Рис. 3. Поверхность стенки поры матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), гидроксиапатита (В), желатина и гидроксиапатита (Г). Изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Введение в структуру матрикса гидроксиапатита и желатина приводит к изменению тонкой архитектуры поверхности пор матрикса

ние пор также обеспечивает обмен питательной среды, удаление продуктов метаболизма и таким образом способствует созданию гомогенной среды внутри матриц [5, 7–9].

Изучение матриц методом КЛСМ показало, что водная среда ни непосредственно после погружения, ни через 1 ч, ни через 1 сут не влияет на целостность и пористость матриц как фибринового, так и всех композитных. Это очень важное свойство изделий, так как разрушение и изменение базовой структуры и физических свойств имплантата в водной среде может сделать невозможным его применение *in vivo*. Изделия не обладали какими-либо значительными гигроскопическими свойствами и не набухали, что позволило им сохранить заданные параметры.

Для поддержания жизнеспособности субстрат-зависимых клеток в трехмерной культуре необходима их адгезия на поверхность матрикса [10, 11]. Субстрат влияет на продукцию клетками компонентов внеклеточного матрикса, на его синтез и состав. Способность поддерживать адгезию клеток и их пролиферацию считается важным показателем биосовместимости *in vitro* материала, служащего субстратом [10–12]. Материал, оказывающий ингибирующее действие, будет замедлять восстановление тканей *in vivo*.

Фиброин шелка – белок, обладающий свойствами материала, необходимого для регенерации костной

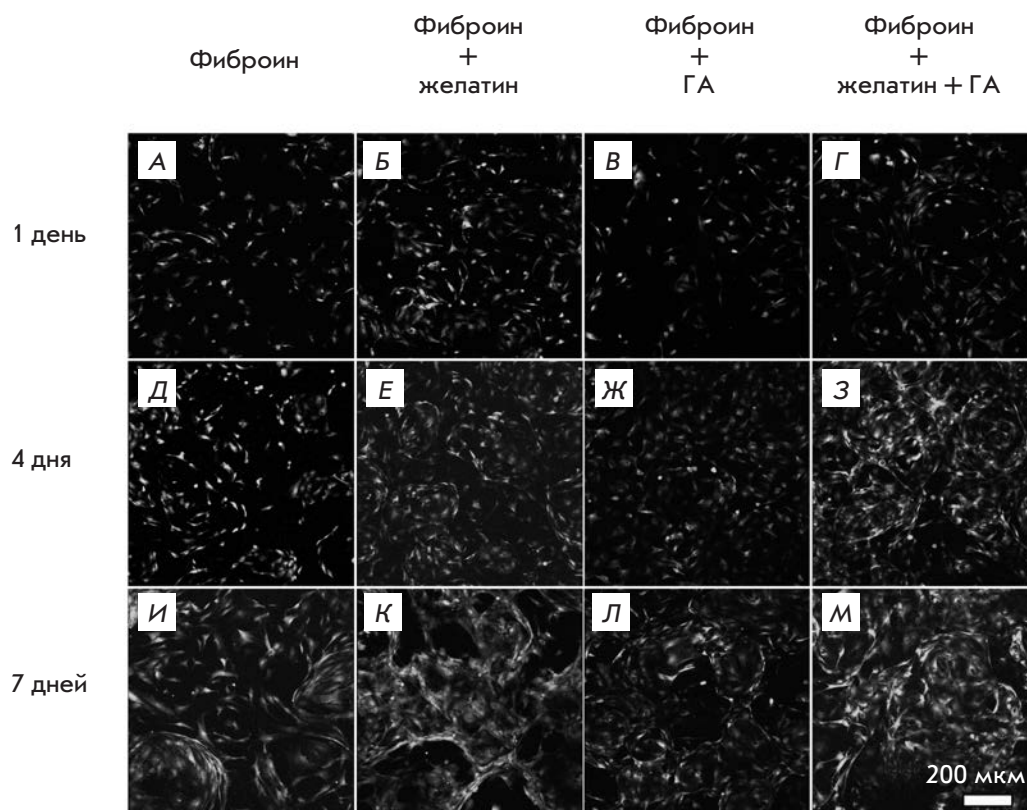


Рис. 4. Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ), экспрессирующие GFP на матриксах из фиброина шелка (А, Д, И) и композитных матриксах на основе фиброина шелка и желатина (Б, Е, К), гидроксиапатита (В, Ж, Л), желатина и гидроксиапатита (Г, З, М), через 1 (А–Г), 4 (Д–З) и 7 (И–М) дней культивирования. Представлены изображения проекции серий оптических срезов на плоскость

ткани. Фиброин не обладает канцерогенным, токсическим и аллергическим действием на организм, не вызывает местной воспалительной реакции, не провоцирует развитие инфекции, замещается со временем нативной тканью пациента, сохраняет функциональные свойства в течение предусмотренного срока и является высокопрочным материалом [5–7]

Фиброин – это амфифильный белок со значительным перевесом в сторону гидрофобности [13]. Его изоэлектрическая точка pI 4.2. По этой причине фиброин нерастворим в воде, разбавленных растворах многих кислот и щелочей [13], а при физиологическом значении pH 7 становится отрицательно заряженным, в отличие от положительно заряженного спидроина [5], что способствует снижению адгезии и увеличению скорости пролиферации клеток [5].

В качестве добавки в композитный материал использовали желатин – производное коллагена. Коллаген – основной фибриллярный компонент внеклеточного матрикса и соединительной ткани, имеет молекулярную массу 300 кДа и составляет около 30% общей массы белков у млекопитающих. Коллаген присутствует почти во всех типах ткани, обеспечивая прочность и структурную стабильность. Этот материал не токсичен и обладает слабыми аллергенными свойствами. К серьезным недостаткам коллагеновых матриксов можно отнести быстрое и лишь частично

регулируемое бифункциональными агентами время биодegradации, ограничивающее срок функционирования коллагеновых изделий 1 мес., и низкие механические свойства. Желатин является продуктом денатурации коллагена. Желатин содержит большое количество остатков глицина, пролина и 4-гидроксипролина, а также последовательности из трех аминокислот – аргинина, глицина и аспартата (RGD), с которыми связываются клеточные рецепторы интегрины, что обуславливает адгезию и пролиферацию клеток. Подобные последовательности найдены и в других белках внеклеточного матрикса. Однако использование их значительно увеличивает себестоимость изделий.

В ходе работы нами изучено влияние внесения добавок при изготовлении матрикса на адгезию и пролиферацию первичной культуры МЭФ. Фибробласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, способную продуцировать такие компоненты внеклеточного матрикса, как проколлаген, фибронектин, проэластин, глюкозаминогликаны, нидоген, ламинин, тенасцин, хондроитин-2-сульфат. Фибробласты активно участвуют в процессах заживления ран и эпителизации [14]. Кроме того, они способны к секреции факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF), что стимулирует ангиогенез и образование лимфатических сосудов [15, 16]. Мы выбрали первич-

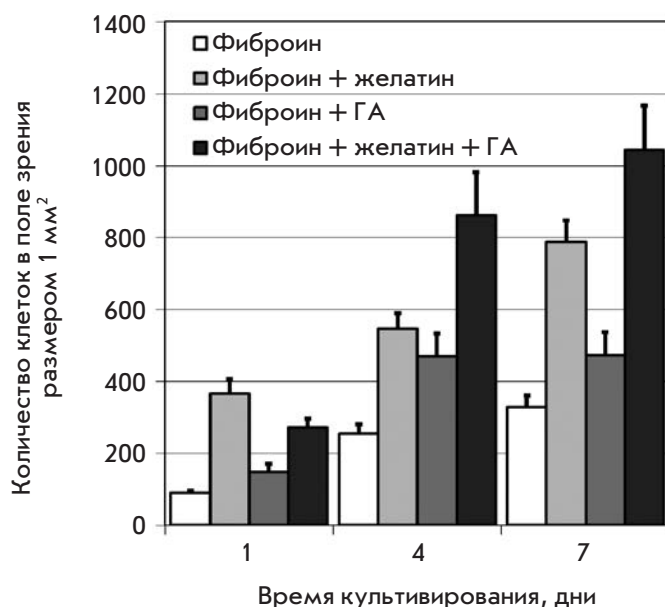


Рис. 5. Увеличение общего количества МЭФ при культивировании на трехмерных пористых матриксах на основе фиброина шелка и композитных материалов

ную культуру эмбриональных фибробластов мыши, пролиферативный потенциал которой больше, чем у клеток постнатальных культур.

Изображения, полученные методом КЛСМ, представляли собой серии горизонтальных оптических срезов матрикса. Для наблюдения были доступны клетки и структуры матрикса на глубине до 300 мкм (рис. 4). Изображения использовали для подсчета клеток. Проводили сравнительный анализ изменения во времени количества клеток, культивируемых на разных матриксах. Введение в структуру матрикса ГА и желатина увеличивает адгезию и ускоряет пролиферацию МЭФ (рис. 5). При этом одновременное включение в структуру и желатина, и ГА приводит к увеличению адгезии и скорости пролиферации.

Так через 1 сут количество клеток на композитном матриксе было в 2.5 раза больше, чем на матриксе из фиброина, а на 4 и 7 день разница увеличилась более чем в 3 раза.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы были изготовлены матриксы на основе фиброина шелка, а также композитные матриксы с добавлением желатина и ГА. Такие матриксы обладают незамкнутой структурой, поддерживают свою целостность и не разрушаются при механических воздействиях. Модификация фиброиновых матриксов одновременно желатином и ГА изменяет свойства их поверхности. Эти изменения приводят к увеличению адгезии и пролиферации МЭФ в трехмерной культуре, что делает модифицированные матриксы перспективными для использования в регенеративной медицине, в частности при регенерации костной ткани. ●

Авторы благодарят руководителя лаборатории электронной микроскопии Г.Н. Давидовича из Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова за помощь в получении изображений СЭМ.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского государственного университета, и на оборудовании ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (государственный контракт № 14.512.11.0006 от 07.03.2013 г.), поддержана РФФИ (грант № 14-04-01799) и Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MIT Initiative.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomezhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., et al. // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. P. e57200.
- Zhao Ya., Yan X., Ding F., Yang Yu., Gu X. // J. Biomed. Sci. Engineering. 2011. V. 4. P. 397–402.
- Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S.C., Wang X. // Adv. Drug Delivery Rev. 2013. V. 65. P. 457–470.
- Kasoju N., Bora U. // Adv. Healthcare Mater. 2012. V. 1. № 4. P. 393–412.
- Агапов И.И., Мойсенович М.М., Дружинина Т.В., Каменчук Я.А., Трофимов К.В., Васильева Т.В., Коньков А.С., Архипо-

- ва А.Ю., Соколова О.С., Гузеев В.В. и др. // ДАН. 2011. Т. 440. № 6. С. 830–833.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., et al. // Biomaterials. 2012. V. 33. № 15. P. 3887–3898.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O.L., Arhipova A.Y., Vasiljeva T.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I., et al. // J. Biomed. Materials Res. 2011. V. 96. № 1. P. 125–131.
- Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М., Богуш В.Г., Соколова О.С., Севастьянов В.И., Дебабов В.Г., Кирпичников М.П. // ДАН. 2009. Т. 426. № 1. С. 127–130.

9. Агапов И.И., Мойсенович М.М., Васильева Т.В., Пустовалова О.Л., Коньков А.С., Архипова А.Ю., Соколова О.С., Богуш В.Г., Севастьянов В.И., Дебабов В.Г. и др. // ДАН. 2010. Т. 433. № 5. С. 699–702.
10. Vacařkova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Sary V. // *Physiol Res.* 2004. V. 53. P. S35–S45.
11. Saltzman M.W. // *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues.* Oxford: Oxford Acad., 2004. 538 p.
12. Edwards S.L., Mitchell W., Matthews J.B., Ingham E., Russell S.J. // *AUTEX Res. J.* 2004. V. 4. P. 86–94.
13. Wenk E., Merkle H.P., Meinel L. // *J. Controlled Release.* 2010. V. 150. P. 128–141.
14. Werner S., Krieg T., Smola H. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 5. P. 998–1008.
15. Trompezinski S., Berthier-Vergnes O., Denis A., Schmitt D., Viac J. // *Exp. Dermatol.* 2004. V. 13. № 2. P. 98–105.
16. Bauer S.M., Bauer R.J., Liu Z.J., Chen H., Goldstein L., Velazquez O.C. // *J. Vasc. Surg.* 2005. V. 41. № 4. P. 699–707.

УДК 577.152.192.3

Влияние модификации поверхности наночастицами золота на биоэлектродокаталитические параметры иммобилизованной билирубиноксидазы

Д. В. Панкратов^{1,2}, Ю. С. Зейфман², А. В. Дударева³, Г. К. Панкратова¹, М. Е. Хлупова¹, Ю. М. Парунова², Д. Н. Зайцев³, Н. Ф. Баширова³, В. О. Попов^{1,2}, С. В. Шлеев^{1,2,3*}

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

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

³Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14

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

Поступило в редакцию 14.12.2013

РЕФЕРАТ Приведены экспериментальные доказательства, подвергающие сомнению широко распространенное мнение о влиянии наночастиц на биоэлектродокаталитические параметры иммобилизованных ферментов. В результате сравнительного изучения биоэлектродокаталитических свойств грибной билирубиноксидазы, адсорбированной на поверхности золотых электродов, модифицированных золотыми наночастицами различного диаметра (5–60 нм), показано, что скорость прямого электронного переноса (средние рассчитанные стандартные константы скорости гетерогенного переноса $31 \pm 9 \text{ c}^{-1}$), а также биокаталитические свойства адсорбированного фермента (средние рассчитанные кажущиеся биоэлектродокаталитические константы $34 \pm 11 \text{ c}^{-1}$) не зависят от размера наночастиц, диаметр которых больше или сопоставим с размером фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА билирубиноксидаза, биоэлектродокатализ, золотые наночастицы, прямой электронный перенос.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3D – трехмерный (three-dimensional); A_{real} – реальная/электрохимическая площадь поверхности; CV – циклическая вольтамперограмма (cyclic voltammogram); ET – электронный перенос (electron transfer); DET – прямой электронный перенос (direct electron transfer); E_{T1}^0 – редокс-потенциал T1-центра фермента; k_0 – стандартная константа реакции гетерогенного электронного переноса; $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ – кажущаяся биоэлектродокаталитическая константа (apparent bioelectrocatalytic constant); MCO – голубая медьсодержащая оксидаза (blue multicopper oxidase); MvBOx – билирубиноксидаза из гриба *Myrothecium verrucaria*; AuNP_n – золотые наночастицы (gold nanoparticles) диаметром n нм; AuNP_n/Au – золотой электрод, модифицированный наночастицами с диаметром n, подвергшийся циклированию в серной кислоте (m-AuNP/Au) или без него (u-AuNP/Au); ThLc – лакказа из гриба *Trametes hirsuta*; PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline); NHE – нормальный водородный электрод (normal hydrogen electrode); SEM – сканирующая электронная микроскопия (scanning electron microscopy); A_{spr} – максимум оптического поглощения; A_{450} – оптическое поглощение при длине волны 450 нм; j_{max} – максимальная плотность тока.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в ряде работ описан эффективный прямой электронный перенос (DET) различных ферментов (включая голубые медьсодержащие оксидазы (MCO)), иммобилизованных на поверхности наноструктурированных электродов, с использо-

ванием металлических и углеродных наночастиц, углеродных нанотрубок, графена и т.п. [1–3]. В качестве основного доказательства ускорения реакций DET в этих работах рассматривается повышение биоэлектродокаталитического тока при использовании наноструктурированных поверхностей, однако ко-

личественный сравнительный анализ DET на основе анализа вольтамперограмм, а также расчет стандартных констант реакций гетерогенного электронного переноса (k_0) не был проведен. Более того, даже в случае одного фермента, в частности лакказы из гриба *Trametes hirsuta* (ThLc), иммобилизованной на поверхности золота, получены противоречивые данные. Например, использование AuNP и нанопористого золота приводило к повышению DET [4], в то время как у модифицированных золотом нано/микроструктурированных кремниевых чипов с иммобилизованным на поверхности ферментом наблюдалась крайне низкая биоэлектрокаталитическая активность фермента в случае DET [5]. Ввиду того, что использование биоэлектродов, не имеющих наномодифицированной поверхности, приводит к крайне низкой скорости гетерогенного переноса, а иногда и к полному отсутствию DET, наиболее часто встречающееся объяснение «наносвязыванию» ферментов сводится к способствующей DET ориентации фермента на наноструктурированной поверхности.

Несмотря на то что возможную зависимость величины k_0 от размера металлических и углеродных наночастиц не изучали и в недавних работах (например, в работе [6]) продемонстрированы две противоположные зависимости биоэлектрокаталитического тока восстановления кислорода от диаметра AuNP на электродах, модифицированных МСО, по-прежнему считается, что размер AuNP, используемых для наномодификации электрода, является крайне важным фактором, определяющим ЕТ в реакциях между редокс-ферментом и поверхностью электрода. В данной работе приведены экспериментальные результаты, доказывающие несостоятельность этой гипотезы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 , H_2SO_4 , NaBH_4 , цитрат натрия были получены из Sigma-Aldrich GmbH (США) и использовались без дополнительной очистки. Кислород был приобретен в AGA Gas AB (Швеция). Буферные и другие растворы готовили на деионизированной воде (18 Мом·см), полученной с использованием системы PURELAB UNQ II из ELGA Labwater (Великобритания). Все эксперименты проводили при комнатной температуре в PBS (рН 7.4), состоящем из 50 мМ раствора $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, содержащего 150 мМ NaCl .

Препарат *MvVOx* получен как подарок от компании Amano Enzyme Inc. (Япония).

Электрохимические измерения осуществляли при помощи потенциостата/гальваностата $\mu\text{Autolab}$

Типе III/FRA2 от Metrohm Autolab B.V. (Нидерланды) с использованием трехэлектродной схемы с насыщенным каломельным электродом сравнения (242 мВ относительно нормального водородного электрода, NHE) и платиновой нитью как вспомогательным электродом.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ванны Ultrasonic Cleaner XB2 от VWR International Ltd. (Великобритания). SEM осуществляли на сканирующем электронном микроскопе высокого разрешения FEI Nova NanoLab 600 (Нидерланды). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре УФ-видимой области PharmaSpec UV-1700 (Китай).

С целью изучения влияния размера AuNP на биоэлектрокаталитические свойства *MvVOx* были синтезированы наночастицы диаметром от 5 до 60 нм.

Синтез наночастиц золота заданного размера

AuNP с ожидаемым диаметром 5 нм (AuNP_5 , *рис. 1А*) были синтезированы по методике, описанной в работе [7]. 50 мл 250 мкМ раствора HAuCl_4 перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре, затем к исходному раствору добавляли 1111 мкл 38.8 мМ раствора цитрата натрия и перемешивали в течение еще 1 мин, после чего 555 мкл свежеприготовленного NaBH_4 с концентрацией 0.075 вес. % в 38.8 мМ растворе цитрата натрия приливали к реакционной смеси, после чего раствор перемешивали в течение 5 мин.

AuNP диаметром 20–60 нм (*рис. 1А*) были синтезированы с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя. 50 мл 250 мкМ раствора HAuCl_4 нагревали до кипения при постоянном перемешивании, затем добавляли 750, 500 или 260 мкл раствора с массовой долей цитрата натрия 1% для получения AuNP размером 20, 40 и 60 нм (AuNP_{20} , AuNP_{40} и AuNP_{60}) соответственно. После добавления цитрата натрия смесь выдерживали в течение 10 мин без нагревания при постоянном перемешивании.

Размер полученных наночастиц оценивали спектрофотометрически в соответствии с методикой, описанной в работе [7], используя длину волны в максимуме оптического поглощения (A_{spr} , *рис. 1Г*). Для AuNP размером менее 35 нм диаметр рассчитывали из отношения A_{spr}/A_{450} .

Размер наночастиц 20–60 нм дополнительно определяли при помощи SEM. Образцы для микроскопии получали нанесением небольшого объема AuNP из разбавленных коллоидных растворов на поверхность плоских золотых электродов (*рис. 1Б*). Следует специально отметить, что структура поверхности электродов, использованных в дальнейших исследованиях, принципиально отлична от представленной на *рис. 1* ввиду значительно большего количества

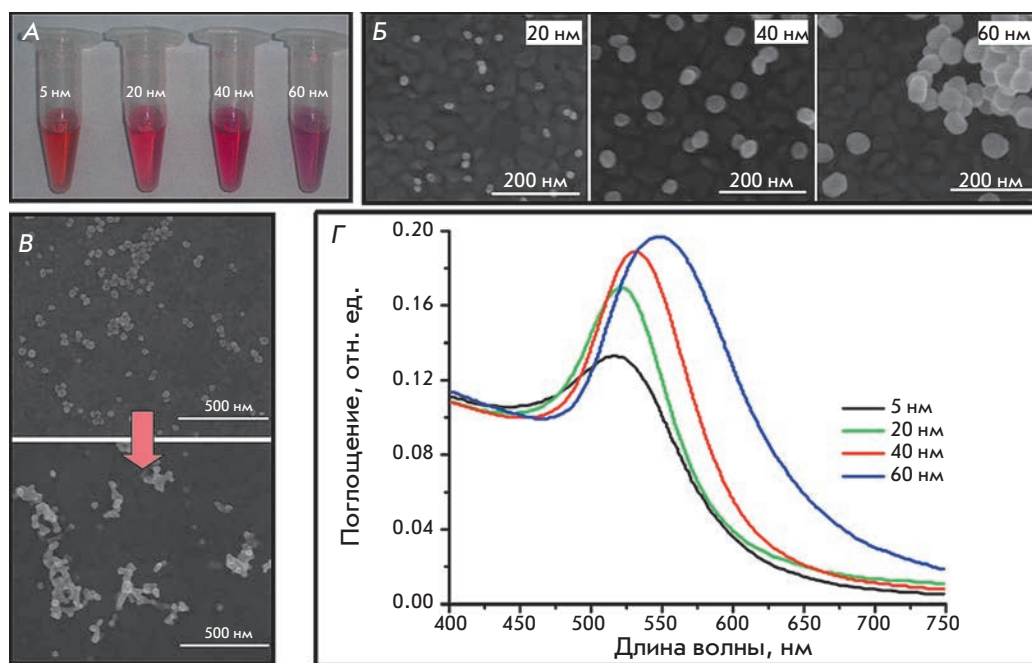


Рис. 1. А – фотография коллоидных растворов синтезированных AuNP. Б – SEM-изображения образцов AuNP/Au. В – SEM-изображение AuNP₄₀/Au до (вверху) и после (внизу) двух циклов обработки в H₂SO₄. Г – спектры оптического поглощения суспензий AuNP различного диаметра

наносимых AuNP и изменения поверхности вследствие обработки в серной кислоте (см. ниже) и может использоваться только для оценки размера синтезированных AuNP.

Результаты анализа размера наночастиц, полученные независимыми методами, представлены в табл. 1.

Из рис. 1Б,Г можно сделать вывод, что непосредственное определение размера AuNP методом SEM дает наиболее точные и непротиворечивые данные с возможностью статистической оценки распределения частиц по размерам. Однако данный метод имеет свои ограничения по чувствительности, в частности, в нашем случае не представлялось возможным оценить размер наночастиц менее 10 нм.

Все полученные растворы AuNP, за исключением AuNP диаметром 5 нм, концентрировали центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин. 95% супернатанта отбиралось, преципитат AuNP ресуспензировался ультразвуковой обработкой. Концентрирование наночастиц диаметром 5 нм с помощью предложенного метода осуществить не удалось, поэтому в дальнейших экспериментах использовали разбавленный раствор.

Очистка золотых электродов и их модификация AuNP

Поликристаллические золотые дисковые электроды от компании Bioanalytical Systems (США) с геометрической площадью поверхности 0.031 см² механически очищали полировкой на бумаге Microcloth (Buehler,

Великобритания) в суспензии оксида алюминия с размером частиц 0.1 мкм, купленной в Struers (Дания), до получения зеркальной поверхности. Далее электроды промывали деионизированной водой и электрохимически очищали циклированием в 0.5 М H₂SO₄ в диапазоне потенциалов от -0.1 до +1.9 В относительно NHE в течение 20 циклов со скоростью развертки потенциала 0.1 В · с⁻¹, промывали водой и высушивали в потоке воздуха.

Затем 5 мкл раствора в случае концентрированных суспензий и 6 мкл в случае суспензии AuNP с диаметром 5 нм (AuNP₅) наносили на поверхность очищенного золотого электрода, после чего модифицированный электрод высушивали при комнатной

Таблица 1. Сравнительный анализ размеров синтезированных AuNP, определенных различными методами

	Диаметр AuNP, нм		
	ожидаемый	определенный спектрофотометрически	определенный из данных SEM
20		16	19 ± 2
40		42–51	38 ± 5
60		77	59 ± 5

температуре. Процедуру модификации AuNP повторяли 2 раза для концентрированных суспензий наночастиц и 5 раз в случае AuNP₅. Полученные электроды циклировали в 0.5 М H₂SO₄ в диапазоне потенциалов от 0.0 до +1.9 В относительно ННН в течение двух циклов во избежание десорбции и/или агломерации наночастиц на поверхности (рис. 1В) со скоростью развертки потенциала 0.1 В·с⁻¹, промывали водой и высушивали. Электрохимически активную (реальную) площадь поверхности электродов (A_{real}) рассчитывали в соответствии с [8], принимая количество электричества, необходимое для восстановления оксида золота при электрохимическом циклировании в заданных условиях, равным 390 ± 10 мкКл·см⁻²[9].

Результаты расчета A_{real}, представленные в табл. 2, свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости A_{real} от размера AuNP, использованных для модификации поверхности, что косвенно подтверждает полученные ранее результаты [10] о формировании неупорядоченной трехмерной структуры в результате многократного циклирования AuNP/Au электрода в 0.5 М H₂SO₄. В связи с этим в дальнейших экспериментах использовали два типа AuNP/Au электродов: подвергнутых обработке H₂SO₄ (m-AuNP/Au) и без предварительного циклирования (u-AuNP/Au). A_{real} для u-AuNP/Au электродов принимали равной A_{real} для m-AuNP/Au образцов.

Биомодификацию поверхности AuNP/Au электродов осуществляли путем прямой адсорбции фермента в течение 20 мин из раствора MbVOx с концентрацией белка 0.25 мг · мл⁻¹. Поверхностную концентрацию фермента принимали равной 3.0 пмоль·см⁻².

Значения k₀ и k_{cat}^{app} рассчитывали с использованием пакета программ MathCAD 14 по уравнению:

$$j = \frac{j_{\max}}{1 + \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{T1}^{0'})\right] + \frac{k_5}{k_0} \exp\left[\frac{\alpha F}{RT}(E - E_{T1}^{0'})\right]},$$

$$k_5 = \frac{k_{cat}[O_2]}{K_M + [O_2]}$$

Кинетическая схема функционирования фермента, использованная для вывода уравнения, представлена в работе [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные биоэлектроды помещали в насыщенный кислородом PBS с последующей записью CV со скоростью вращения электрода 1500 об·мин⁻¹ для устранения возможных диффузионных ограни-

Таблица 2. Зависимость реальной площади поверхности от размера наночастиц

Диаметр AuNP, нм	Реальная площадь поверхности, см ²
5	0.21 ± 0.01
20	1.40 ± 0.01
40	1.25 ± 0.05
60	1.23 ± 0.03

чений (рис. 2А). Выраженный биоэлектрокаталитический отклик с начальным потенциалом электровосстановления кислорода около 0.75 В зафиксирован для всех использованных электродов. Как видно из рис. 2Б,В, достаточно близкие величины j_{max} получены как в случае биомодифицированных m-AuNP/Au (31.4 ± 5.9 мкА·см⁻²), так и u-AuNP/Au (43.4 ± 5.6 мкА·см⁻²) электродов.

С учетом полученных данных были рассчитаны значения k₀ (31 ± 9 с⁻¹) и k_{cat}^{app} (34 ± 11 с⁻¹). Результаты расчетов представлены на рис. 2Г. Видно, что рассчитанные величины как k₀, так и k_{cat}^{app}, имеют сходные значения независимо от диаметра использованных AuNP и от типа электрода. Сходство величин констант для электродов на основе m-AuNP/Au и u-AuNP/Au свидетельствует о том, что допущение об идентичности реальной площади поверхности (при различной структуре) для обоих типов образцов не вносит критической погрешности в расчеты. Завышенное значение констант в случае u-AuNP/Au свидетельствует о немного большей площади поверхности данных электродов по сравнению с m-AuNP/Au, что объясняется отсутствием агломератов AuNP (рис. 1В), приводящим к уменьшению реальной площади. Выявленные изгибы кривых зависимости констант от размера AuNP, наблюдаемые при использовании m-AuNP/Au, могут быть обусловлены изменением поверхности в результате формирования различных 3D-структур в ходе обработки электродов в H₂SO₄. Поведение фермента на подобных разнородных поверхностях не описывается полностью единой теорией, использованной в данной работе для расчета биокаталитических параметров, без введения дополнительных поправок. Более того, образование 3D-агломератов также приводит к погрешности при использовании единой величины поверхностной концентрации фермента (3.0 пмоль·см⁻²) для всех биоэлектродов на основе m-AuNP/Au, чем также можно объяснить форму кривых. Однако экспериментальные данные и результаты моделирования позволяют с достаточной степенью уверенности

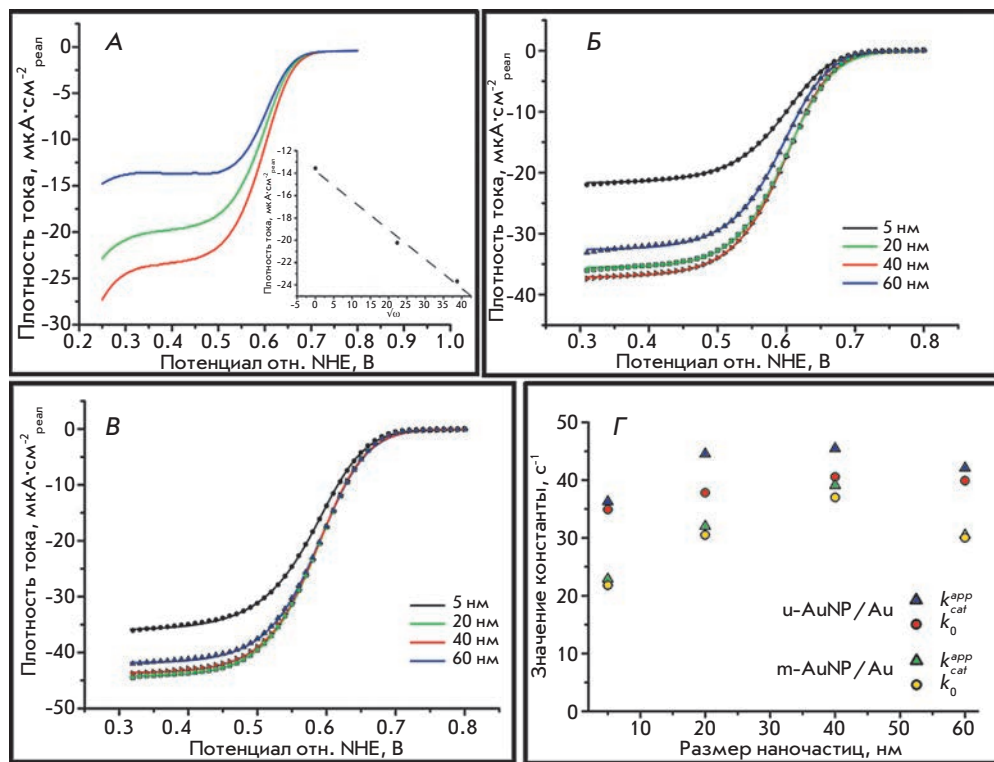


Рис. 2. А – катодная часть CV биомодифицированных m-AuNP₂₀/Au электродов, полученная при различных скоростях вращения, об·мин⁻¹: 0 (синий), 500 (зеленый) и 1500 (красный). Вставка – зависимость плотности тока при 0.35 В от ω^{1/2}. Б, В – катодная часть CV MvVOx-модифицированных m-AuNP/Au (Б) и u-AuNP/Au (В) на основе AuNP различного диаметра. Г – зависимость рассчитанных значений биоэлектрод-каталитических параметров от размера AuNP. Условия для всех CV: насыщенный кислородом PBS, скорость развертки потенциала – 20 мВ·с⁻¹, второй цикл

утверждать, что биоэлектродокаталитические характеристики MvVOx, иммобилизованной на AuNP/Au-поверхности не зависят от диаметра наночастиц, а полученное во многих предыдущих работах увеличение электродокаталитических токов биоэлектродов при их модификации наночастицами различного размера связано, скорее всего, с увеличением геометрической площади поверхности, а не с ускорением реакций DET или увеличением биоэлектродокаталитических констант иммобилизованных ферментов.

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы экспериментально показано отсутствие зависимости биоэлектродокаталитических параметров MvVOx, иммобилизованной

на поверхности AuNP/Au, от размера наночастиц. Однако стоит отметить, что полученные нами результаты не могут быть экстраполированы на другие нанобиомодифицированные поверхности, например другие наночастицы и редокс-ферменты. В частности, особый интерес представляет изучение влияния наночастиц с диаметром, не превышающим размер фермента, которые могут способствовать электронному переносу между ферментом и поверхностью электрода. Подобные эксперименты позволят получить более полную картину влияния наночастиц на биоэлектродокаталитические параметры оксидоредуктаз. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-33102-мол-а-вед).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murata K., Kajiya K., Nakamura N., Ohno H. // *Energy & Environmental Sci.* 2009. V. 2. № 12. P. 1280–1285.
- Dagys M., Haberska K., Shleev S., Arnebrant T., Kulys J., Ruzgas T. // *Electrochem. Comm.* 2010. V. 12. № 7. P. 933–935.
- Pankratov D.V., Zeifman Y.S., Morozova O.V., Shumakov G.P., Vasil'eva I.S., Shleev S., Popov V.O., Yaropolov A.I. // *Electroanalysis.* 2013. V. 25. № 5. P. 1143–1149.
- Salaj-Kosla U., Poller S., Schuhmann W., Shleev S., Magner E. // *Bioelectrochemistry.* 2013. V. 91. P. 15–20.
- Ressine A., Vaz-Dominguez C., Fernandez V.M., De Lacey A.L., Laurell T., Ruzgas T., Shleev S. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2010. V. 25. № 5. P. 1001–1007.
- Gutierrez-Sanchez C., Pita M., Vaz-Dominguez C., Shleev S., De Lacey A.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 41. P. 17212–17220.
- Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221.
- Murata K., Kajiya K., Nukaga M., Suga Y., Watanabe T., Nakamura N., Ohno H. // *Electroanalysis.* 2010. V. 22. № 2. P. 185–190.
- Trasatti S., Petrii O.A. // *Pure Appl. Chem.* 1991. V. 63. № 5. P. 711–734.
- Wang X., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2012. V. 31. № 1. P. 219–225.
- Climent V., Zhang J.D., Friis E.P., Østergaard L.H., Ulstrup J. // *J. Phys. Chem. C.* 2012. V. 116. № 1. P. 1232–1243.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков (примерно 40 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков (20 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись следует присылать в редакцию в электронном виде: текст в формате Word 2003 for Windows, рисунки в формате TIFF. Отдельным файлом присылается перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, списка литературы и подписей к рисункам.

При подаче статьи авторы заключают с редакцией договор о передаче права на использование произведения. Форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru. Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала *Acta Naturae*, или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 628.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, 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 μM ; 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 (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзыва.

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.