

# Письмо редакторов

**У**важаемые читатели! Редакционная коллегия и редакционный совет предлагают вашему вниманию очередной, 19-й номер журнала *Acta Naturae*. Анализируя публикационную активность и цитирование, мы с радостью можем констатировать, что журнал нашел своего читателя, а уровень публикаций постоянно растет. Относительно недавно изданием заинтересовалась известная консалтинговая компания *Macmillan Science Communication*, сотрудничающая с *Nature Publishing Group*. Эта компания отобрала наш журнал (среди трех российских научных журналов) в качестве модели для продвижения в России. В содружестве со SkolTech *Macmillan Science Communication* составлен бизнес-план, нацеленный на увеличение читательского интереса к изданию и повышению цитирования. Нам есть куда расти. Достаточно отметить, что старейший отечественный журнал «Биохимия» (*Biochemistry, Moscow*) имеет импакт-фактор за 2012 год 1.149, что вполне достижимо для *Acta Naturae*, возможно, в недалеком будущем (импакт-фактор *Acta Naturae* за 2012 год 0.477). Портфель редакции имеет вполне солидный «запас прочности», что, впрочем, не отражается на увеличении сроков публикации статей. В ряде случаев при благоприятных двух рецензиях срок публикации не превышает и двух месяцев. Естественно, что в «тяжелых» случаях при повторных рецензированиях время публикации может затянуться и на полгода. Мы были бы заинтересованы в увеличении доли статей в области фундаментальной медицины и хороших обзорах, полезных для молодежной и даже студенческой аудитории.

В этом номере мы сохранили традиционную рубрику и предлагаем вам несколько интересных обзоров, оригинальных статей и раздел «Форум», посвященный итогам 38-го Конгресса Федерации европейских биохимических обществ (FEBS 38), проходившего в этом году в Санкт-Петербурге. Внимание читателей предлагается обзор Е.А. Васьковой с соавт., посвященный феномену «эпигенетической памяти» плюрипотентных стволовых

клеток. Наш журнал уделял должное внимание проблемам репрограммирования стволовых клеток, и в этой связи предлагаемая статья дополнит имеющиеся сведения в этой области. Следующая публикация (А.Л. Риппа и соавт.) в разделе «Обзоры» отражает, по мнению редакции, современные тенденции в направлении регенеративной медицины. Она посвящена роли интегринов в формировании эпидермиса. Третий обзор посвящен аптамерам (А.В. Лахин и др.). По всей видимости, эти миметики в скором времени займут определенное место в биофармацевтике.

Экспериментальный раздел открывается статьей Р. Шах-Махмуда и О.Н. Ильинской о роли рибонуклеазы в противодействии пандемическому вирусу гриппа А (H1N1). В статье группы П.Г. Георгиева рассматриваются классические проблемы молекулярной биологии. Она имеет несколько провокационное название: «Конкуренция внутри интронов: сплайсинг побеждает полиаденилирование». Не осталась в стороне и классическая энзимология в статье группы В.И. Тишкова, описывающей структурные аспекты гидролазы эфиров альфа-аминокислот. Проблемы врожденного иммунитета нашли отражение в статье Е.Р. Садчиковой с соавт. Наш журнал позитивно относится и к хорошим статьям в области нейрофизиологии, в частности, в этом номере опубликована статья из очень сильной Казанской школы (А.Л. Зефилов с соавт.). Механизмы аутоиммунных патологий и модели этих заболеваний изложены в статьях Я.А. Ломакина с соавт. и А.Г. Соболева с соавт. Молекулярные механизмы стресса рассмотрены в статье Д.Н. Барякина с соавт. Работы группы С.Б. Середина и А.Н. Веревкина посвящены исследованию механизмов патологических состояний и разработке потенциальных лекарственных средств при депрессии и сахарном диабете 2 типа.

В заключение хочется от всей души пожелать читателям журнала здоровья и всяческих успехов в Новом 2014 году! ●

*Редколлегия*

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

Работает при финансовой  
поддержке Министерства  
образования и науки РФ



Лучшее российское интернет-СМИ  
о науке, образовании, инновациях

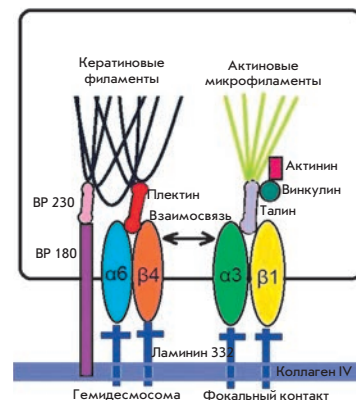
*"На мобильных устройствах с диагональю менее 7"  
загружается облегченная версия сайта*



## Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи

А. Л. Риппа, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев, В. В. Терских

Интегрины играют важнейшую роль в регуляции адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Создание мышей с тканеспецифическим нокаутом генов интегринов и определение генетической основы ряда кожных заболеваний у человека позволили понять значение интегринов в биологии, физиологии и морфогенезе эпидермиса и волосяного фолликула. Обсуждаются данные о роли различных классов интегриновых рецепторов в биологии эпидермальных клеток, развитии эпидермиса и волосяных фолликулов.



Интегриновые рецепторы во взаимодействии матрикс–клетка

## Моделирование трехмерной структуры гидролазы эфиров альфа-аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*



Общий вид тетрамера XrAEN

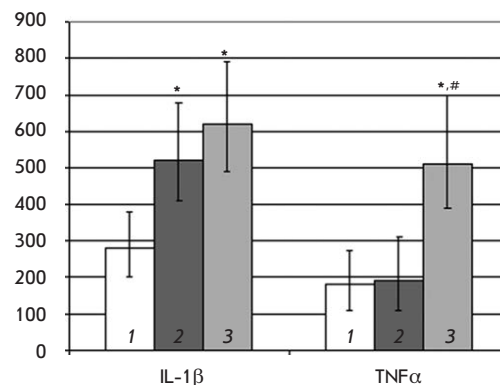
С. А. Зарубина, И. В. Упоров, Е. А. Федорчук, В. В. Федорчук, А. В. Склярченко, С. В. Яроцкий, В. И. Тишков

Гидролаза эфиров  $\alpha$ -аминокислот (АЕН) является перспективным биокатализатором синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков – как пенициллинов, так и цефалоспоринов. Методом гомологичного моделирования построена структура АЕН из *Xanthomonas rubrilineans* (XrAEN) и проведен анализ его активного центра. С помощью докинга получены структуры комплексов XrAEN с ампициллином, амоксициллином, цефалексином, метиловыми эфирами *D*-фенилглицина и 4-окси-*D*-фенилглицина и определен ряд антибиотиков, при синтезе которых фермент XrAEN будет наиболее эффективен.

## Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета

А. Д. Черноусов, М. Ф. Никонова, Н. И. Шарова, А. Н. Митин, М. М. Литвина, П. Е. Садчиков, И. Л. Гольдман, А. А. Ярилин, Е. Р. Садчикова

Инновационный продукт Неолактоферрин представляет собой естественную комбинацию рекомбинантного лактоферрина человека (90%) и лактоферрина козы (10%), выделенных из молока коз-продуцентов, несущих в геноме полноразмерный ген лактоферрина человека. Изучено действие Неолактоферрина на клетки иммунной системы человека. Показано, что Неолактоферрин обладает иммуностимулирующей активностью, сдерживает развитие иммунных процессов по воспалительному пути. Обогащение Неолактоферрина ионами железа усиливает его провоспалительную активность.



Влияние Неолакта и Неолакта, обогащенного железом, на секрецию моноцитами цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$

# Acta Naturae

ТОМ 5, № 4 (19), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2013

## 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. Габитов, 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

*Корректура:* Р.С. Шаймарданова  
*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

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

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

© ACTA NATURAE, 2013

Номер подписан в печать 11 декабря 2013 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/](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

FEBS 38 в Петербурге..... 6

### ОБЗОРЫ

Е. А. Васькова, А. Е. Стеклова, С. П. Медведев,  
С. М. Закиян

«Феномен «эпигенетической памяти»  
индуцированных плюрипотентных  
стволовых клеток..... 15

А. Л. Риппа, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев,  
В. В. Терских

Роль интегринов в формировании и гомеоста-  
зе эпидермиса и придатков кожи..... 24

А. В. Лахин, В. З. Тарантул, Л. В. Генинг

Аптамеры: проблемы, пути их решения  
и перспективы..... 37

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Р. Шах Махмуд, О. Н. Ильинская  
**Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1)..... 49**
- М. В. Тихонов, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко  
**Конкуренция внутри интронов: сплайсинг побеждает полиаденилирование..... 57**
- С. А. Зарубина, И. В. Упоров, Е. А. Федорчук, В. В. Федорчук, А. В. Склярченко, С. В. Яроцкий, В. И. Тишков  
**Моделирование трехмерной структуры гидролазы эфиров альфа-аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*..... 68**
- А. Д. Черноусов, М. Ф. Никонова, Н. И. Шарова, А. Н. Митин, М. М. Литвина, П. Е. Садчиков, И. Л. Гольдман, [А. А. Ярилин], Е. Р. Садчикова  
**Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета .. 78**
- М. М. Абдрахманов, А. М. Петров, П. Н. Григорьев, А. Л. Зефилов  
**Управляемый деполяризацией кальций-независимый экзо- и эндоцитоз синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки ..... 85**
- Д. Н. Барякин, Д. В. Семенов, А. В. Савельева, О. А. Коваль, И. В. Рабинов, Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер  
**Аналоги Alu- и 7SL РНК подавляют жизнеспособность клеток MCF-7, модулируя транскрипцию генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулаума ..... 92**

Я. А. Ломакин, М. Ю. Захарова, А. А. Белогуров, Н. А. Быкова, М. А. Дронина, А. Е. Тупикин, В. Д. Кнорре, А. Н. Бойко, А. В. Фаворов, М. Р. Кабилов, Н. А. Пономаренко, А. Г. Габибов

**Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования .... 104**

С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева, Т. Л. Гарибова, Г. М. Молодавкин, С. А. Литвинова, О. А. Елизарова, В. И. Посева

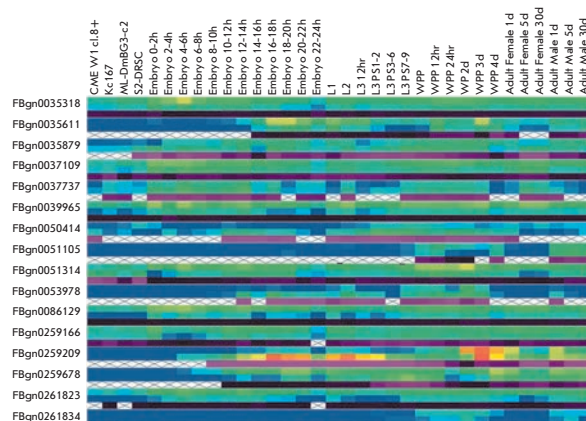
**Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106 ..... 116**

А. Г. Соболева, В. В. Соболев, А. С. Брускин, А. В. Мезенцев

**Трехмерная модель мышинового эпидермиса для лабораторных исследований псориаза..... 121**

Т. Н. Попова, А. А. Агарков, А. Н. Веревкин  
**Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина .... 129**

**Правила для авторов ..... 135**



## РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Тепловая карта, иллюстрирующая паттерны экспрессии генов (см. статью Тихонова и др.)

# FEBS 38 в Петербурге

2013 год был ознаменован для российской научной общественности, работающей в области «наук о жизни», крупнейшим событием – проведением в Санкт-Петербурге с 6 по 11 июля 38-го Конгресса Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО – FEBS). Пресса и средства массовой информации (необходимо отметить, что РИА «Новости» было официальным партнером Конгресса) достаточно активно освещали это событие, тем не менее многое осталось за кадром. Журнал *Acta Naturae* и люди, его делающие, принимали самое активное участие в организации и проведении этого форума. В последнем в этом году номере журнала мы бы хотели поделиться своими впечатлениями «изнутри» и дать анализ произошедшего.

## НЕМНОГО СТАТИСТИКИ И СРАВНЕНИЕ С «ЗАПАДОМ»

Организация FEBS объединяет более 36 000 исследователей в 35 Национальных биохимических обществах стран Европы. Ее деятельность распространяется далеко за пределы конгрессной платформы. В структуру FEBS входят комиссии по изданию журналов (*FEBS Journal*; *FEBS Letters* и др.), «Наука и общество», «Женщины в науке», секция образования, комитет по стипендиям и др. Организация FEBS очень демократическая и предполагает регулярные перевыборы руководства и председателей комитетов.

Конгрессы FEBS ежегодно проходят в европейских странах в течение уже около 40 лет и объединяют научную европейскую общественность, работающую в области наук о жизни. Тематика конгрессов за последние годы значительно расширилась и в известном смысле пересекается с тематикой конгрессов по биофизике, нейронаукам, иммунологии. Эта тенденция не случайна, так как стремление к глубокой специализации направлений исследований, характерное для конца XX столетия, имеет тенденцию быть замененным на «универсализацию» исследований и активное сочетание дисциплин и экспериментальных подходов. Внедрение «omics», глубокого секвенирования, применение плат-

Таблица 1. Количество участников Конгресса по странам (представлены данные по первым 20 странам)

	Россия	864		Корея	53
	Турция	151		Украина	52
	Польша	115		Португалия	46
	Италия	112		Япония	31
	США	111		Израиль	29
	Германия	107		Греция	27
	Великобритания	95		Нидерланды	27
	Чехия	84		Румыния	26
	Франция	83		Хорватия	23
	Испания	73		Венгрия	23

форм ЯМР, рентгеноструктурного анализа с использованием методов QM/MD действительно позволяет комплексно подойти к решению задач биологии и молекулярной медицины. Такое положение дел не могло не отразиться на про-

граммах больших международных форумов. Требования к их организации возросли многократно. В настоящее время привлечение нескольких тысяч человек одновременно, своего рода научных «флешмобов», требует от орга-



Таблица 2. Основные и спутные симпозиумы 38-го Конгресса FEBS

**Основные симпозиумы**

**I. Механизмы генетического контроля**

- ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМОВ ЭУКАРИОТ (S1)** *Председатели: Wendy Bickmore, С. Разин*  
**МИР РНК (S2)** *Председатели: О. Донцова, Eric Westhof*  
**ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК (S3)** *Председатели: Е. Громова, О. Лаврик, Leon Mullenders*  
**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ГЕНОМИКА (W4)** *Председатели: К.Г. Скрябин, Huapting Yang*  
**НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК МИШЕНИ В ТЕРАПИИ (W5)** *Председатель: В. Власов*

**II. Механизмы биокатализа и динамики белков**

- БИОКАТАЛИЗ: ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ (S6)** *Председатели: Michael Blackburn, А. Габибов*  
**СТРУКТУРА И ФОЛДИНГ БЕЛКОВ (S7)** *Председатели: Cyrus Chothia, А. Финкельштейн*  
**ДИНАМИКА БЕЛКОВ (W8)** *Председатели: А. Арсеньев, О. Федорова, Jaak Jarv*  
**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ (W9)**  
*Председатели: Patrick Masson, С. Варфоломеев*  
**МЕМОРИАЛЬНЫЙ СИМПОЗИУМ, ПОСВЯЩЕННЫЙ ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА БРАУНШТЕЙНА: ФЕРМЕНТЫ, КОФАКТОРЫ, МЕХАНИЗМЫ (W10)** *Председатели: Т. Демидкина, Andrea Mozzarelli, В. Тишков*

**III. Механизмы коммуникации и сигнализации**

- ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ: ОТ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ К ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ МЕХАНИЗМАМ (S11)** *Председатели: А. Казначеева, О. Крышталь, Alan North, В. Цетлин*  
**МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ И СЕКРЕЦИЯ: ОТ НЕФРОНОВ К НЕЙРОНАМ (S12)** *Председатели: Qais Al-Awqati, Dominique Eladari, А. Петренко*  
**БИОХИМИЯ ОТВЕТА НА СТРЕСС (S13)** *Председатели: В. Маргулис, Gabriele Multhoff*  
**«МИТОХОНДРИОЛОГИЯ»: НОВЫЕ ПОДХОДЫ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ (S14)** *Председатели: Sergio Papa, В. Скулачев*  
**КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕОЛИЗА (S15)** *Председатели: Aaron Ciechanover, Helle Ulrich*

**IV. Молекулярные механизмы заболеваний**

- БИОХИМИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ: СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВ И ДИАГНОСТИКА (S16)** *Председатели: А. Егоров, О. Киселев, С. Колмисаренко, Tomas Zima*  
**БИОХИМИЯ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ (S17)** *Председатели: Г. Георгиев, Joseph Schlessinger*  
**МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ G-БЕЛКАМИ (S18)** *Председатели: Andrew Goryachev, Alfred Wittinghofer*  
**БИОХИМИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ (S19)** *Председатели: Yves Agid, М. Узрюмов*  
**ФОТОРЕЦЕПЦИЯ И БИОХИМИЯ ЗРЕНИЯ (S20)** *Председатели: Karl-Wilhelm Koch, М. Островский*  
**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИМЕНЕНИЕ (S21)** *Председатели: Clare Blackburn, А. Томлин*

**V. Биохимические механизмы иммунной защиты**

- МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АУТОИММУНИТЕТА (S22)** *Председатели: Jean Francois Bach, Ludwig M. Sollid*  
**ИММУНОХИМИЯ И БИОИНЖЕНЕРИЯ (S23)** *Председатели: С. Деев, Andreas Plückthun*  
**В-КЛЕТКИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ И ЗАБОЛЕВАНИЯХ (W24)** *Председатели: Elias Toubi, Moncef Zouali*

**VI. Основные аспекты биохимии**

- ПРОТЕОМИКА И ПЕПТИДОМИКА (S25)** *Председатели: В. Говорун, В. Иванов*  
**МЕТАБОЛИЗМ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ: СТРУКТУРА И АКТИВНОСТИ (S26)** *Председатель: В. Стоник*  
**БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ (S27)** *Председатель: А. Гречкин*  
**ГЛИКОБИОЛОГИЯ: УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (S28)** *Председатели: Н. Бовин, Monica Palcic*  
**БИОИНФОРМАТИКА (W29)** *Председатели: М. Гельфанд, Е. Коопин*  
**СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ (W30)** *Председатели: И. Горянин, Daniel Thomas, М. Самсонова*  
**БИОГЕННЫЕ ПОЛИАМИНЫ В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ (W31)** *Председатели: Robert Casero, А. Хомутов, Heather Wallace*  
**БИОХИМИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ (W32)** *Председатели: А. Гранович, Jorgen Markl, Н. Михайлова*  
**БИОИНЖЕНЕРИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИМЕНЕНИЕ (W33)** *Председатели: В. Попов, В. Шведас*

**Симпозиумы FEBS и спутные симпозиумы**

- ЖЕНЩИНЫ В НАУКЕ** *Председатель: Cecilia Arraino*  
**НАУКА И ОБЩЕСТВО. РАК: МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЧЕНИЕ, ПРОФИЛАКТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ** *Председатели: Jacques-Henry Weil, Alexander Eggertmont, М. Личиницер*  
**ОБРАЗОВАНИЕ В ОБЛАСТИ БИОХИМИИ «БОЛОНСКИЙ ПРОЦЕСС – ДИСКУССИЯ “ЗА” И “ПРОТИВ”»**  
*Председатели: Ferdinand Huch, Т. Овчинникова*  
**КОМИТЕТ ФЕБО ПО ОБРАЗОВАНИЮ: НАУКИ О ЖИВОМ. КРИТЕРИИ ОБРАЗОВАНИЯ** *Председатели: Gül Güner Akdogan, Keith Elliott*  
**ЕМВЛ–РОССИЯ: СОТРУДНИЧЕСТВО РОССИИ И ЕВРОПЫ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИВОМ** *Председатели: Iain Mattaj, В. Панченко*  
**САТЕЛЛИТНЫЙ СИМПОЗИУМ «ЯМР В БИОЛОГИИ»** *Председатель: Isabella C. Felli*  
**НАУЧНОЕ СОВЕЩАНИЕ ПО ГЕНОЦЕНТРИЧНОМУ ПРОЕКТУ «ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА»** *Председатели: Juan Pablo Alba, А. Арчаков, William Hancock, Young Ki-Paik*

низаторов неимоверных усилий по созданию особой научной атмосферы, интересной сразу для нескольких поколений исследователей – от студентов и аспирантов до крупнейших ученых на излете своей карьеры. Бренд FEBS, несмотря на экономические трудности в Европе, собирал большие аудитории: Прага, 2009 (1900 делегатов); Гетеборг, 2010 (1600 участников); Турин, 2011 (1850 человек); Севилья 2012 (2000 человек).

Мы просто не могли занижать планку. На Конгрессе в Санкт-Петербурге было более 2400 человек, что, как мы видим, является рекордом последних лет (табл. 1).

Этот факт удивил руководство FEBS, которое изначально относилось к нам хотя и доброжелательно, но с определенным недоверием. Как удалось этого добиться? Мы сумели собрать уникальную команду докладчиков. Одиннадцать лауреатов Нобелевской премии – живые легенды науки XX и начала XXI века. Интересен и факт научно-политического предвидения руководителя симпозиума «Мембранный транспорт и секреция: от нефронов к нейронам» проф. Александра Петренко, пригласившего в качестве ключевого лектора Джеймса Ротмана (James Rothman), ставшего Нобелевским лауреатом уже после Конгресса, осенью 2013 года. В программе Петербургского конгресса значилось 40 симпозиумов, собравших в общей сложности более 320 докладчиков (табл. 2).

В этом был определенный финансовый и смысловой риск. Количество докладчиков примерно в два раза превышало среднестатистические значения конгрессов прошлых лет. По меткому выражению профессора Израиля Пехта (Israel Pecht), генерального секретаря FEBS, «в Петербурге было собрано два конгресса FEBS». Пустых аудиторий

не было. Научная общественность в интенсивном ритме мигрировала между залами заседаний. Неудобство доставляло лишь отсутствие качественной шумоизоляции между аудиториями.

Нам удалось обеспечить высокий уровень «интернационализма» докладчиков. Как видно из табл. 3, число докладчиков из России было значительным, но не доминирующим, как, к сожалению, это случалось на некоторых других конгрессах FEBS.

Этот факт никак не связан с уровнем отечественной науки. Мы могли бы собрать гораздо больше докладов из России, но при этом не была бы выполнена одна из главных задач конгрессов такого уровня, не были бы представлены различные национальные научные школы. На Конгрессе в Петербурге было много американцев. FEBS борется с этой тенденцией, но мы, не поддавшись давлению, поставили во главу угла «качество науки», а не геополитические проблемы. При этом нам удалось привлечь и очень качественных лекторов из стран «восточного блока» (табл. 3). Мы собрали предложения от национальных комитетов стран постсоветского пространства и стран Восточной Европы и смогли убедить руководителей симпозиумов включить их в программу. В этом Петербургский конгресс выгодно отличается от конгрессов прошлых лет. Крайне интересно, насколько широким будет национальное представительство на Конгрессе 2014 года в Париже и 2015 в Берлине?

Нам удалось собрать достаточно много молодежи: из участников Конгресса 1118 человек – ученые в возрасте до 35 лет (см. диаграммы). Молодые делегаты участвовали в программе Молодежного форума Young Scientists Forum, YSF (117 человек, руководитель канд. хим. наук Алексей Белогу-

Таблица 3. Количество приглашенных докладчиков по странам

США	62	Япония	5
Россия	45	Финляндия	3
Германия	45	Венгрия	3
Великобритания	44	Польша	3
Франция	27	Швеция	3
Италия	14	Дания	3
Швейцария	14	Канада	2
Израиль	12	Чехия	2
Испания	8	Норвегия	2
Португалия	6	Южная Африка	2
Украина	6	Бельгия	1
Китай	4	Греция	1
Нидерланды	4	Хорватия	1

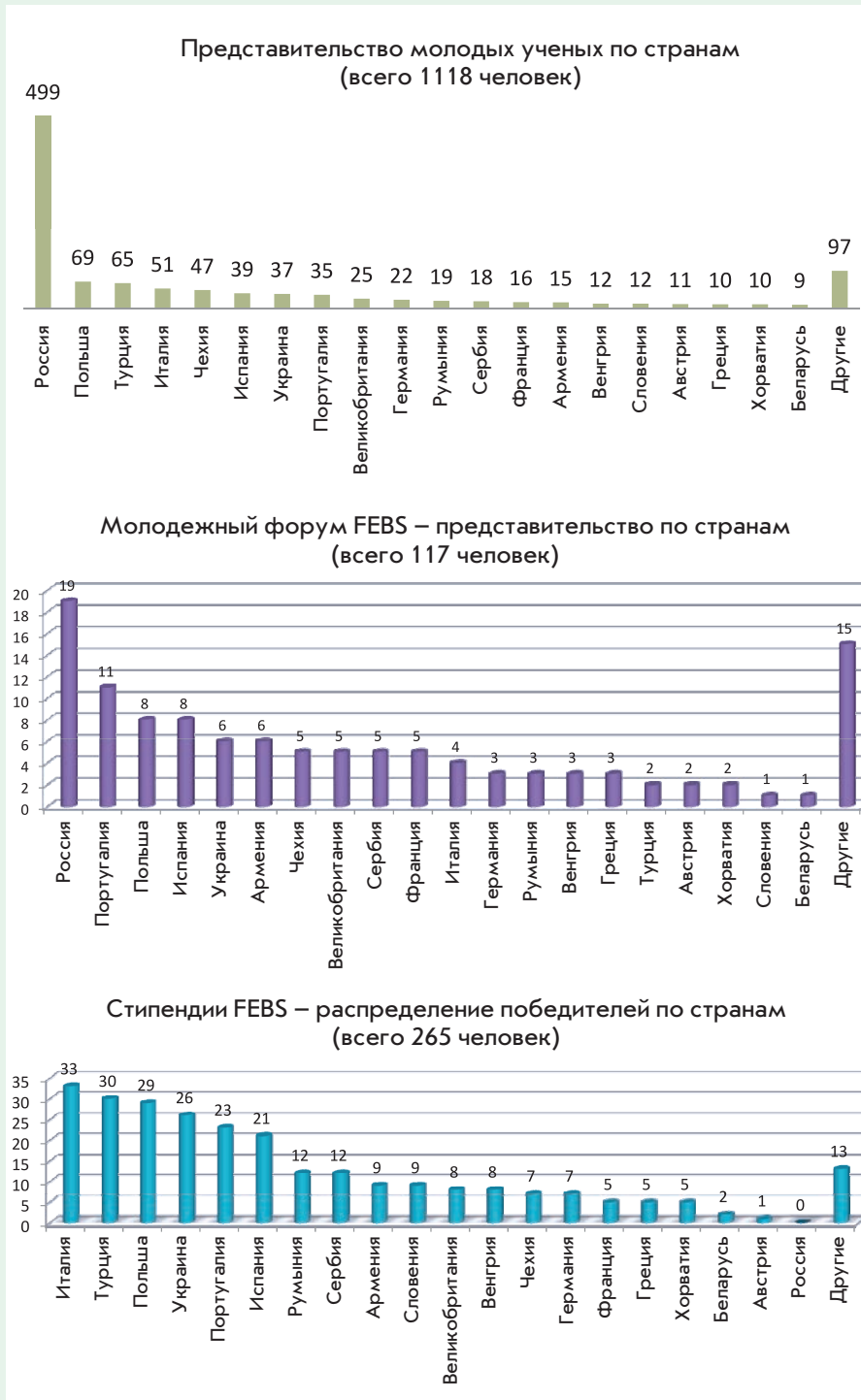
ров), в стипендиальной программе FEBS (265 человек), стали победителями конкурса молодых ученых, поддержанного Министерством образования и науки РФ (198 человек). Была создана уникальная атмосфера общения и возможность увидеть и поговорить с лидерами мировой научной элиты.

Немаловажной компонентой в деле привлечения делегатов 38-го Конгресса FEBS явилось культурное наследие России, Санкт-Петербург, его окрестности. Открытие Конгресса состоялось в зале «Октябрьский» и после торжественной церемонии и пленарной лекции лауреата Нобелевской премии Жюль Хоффмана (Jules Hoffmann), которого представили Конгрессу академик Константин Скрябин и сэр Алан Фершт (Alan Fersht), был показан балет «Лебединое озеро». Благодаря помощи академика Олега Киселева, председателя Санкт-Петербургского биохимического общества, и директора Государственного Эрмитажа Михаила Пиотровского было организовано ночное посещение этой выдающейся мировой коллекции произведений искусства.

### ЗАЧЕМ ЭТОТ ФОРУМ БЫЛ НУЖЕН РОССИИ!

Проведение Конгресса такого уровня достаточно сложное и за-





тратное мероприятие, требующее мобилизации значительных усилий. Вместе с тем необходимо задаться вопросом, почему другие страны с развитой научной инфраструктурой борются за право принимать конгрессы FEBS. Без-

условно, что наука в современном мире становится все более и более уделом богатых стран. В этой связи желание находиться «в мировом тренде» заставляет национальные биохимические общества мобилизовать усилия и, заручив-

шись поддержкой национальных правительств, проводить подобные конгрессы. Советский Союз лишь однажды был удостоен чести принимать конгресс FEBS. В 1984 году академик Юрий Овчинников провел знаковый XVI Конгресс FEBS с участием Лайнуса Полинга, Дороти Ходжкин и других величайших ученых того времени.

38-й Конгресс FEBS подтвердил, что значительная часть отечественных ученых соответствует мировому уровню, так как подавляющее большинство проведенных симпозиумов (33 из 40) наряду с европейскими и американскими председателями возглавлялись российскими учеными, причем не уехавшими за рубеж нашими соотечественниками, а исследователями, имеющими лаборатории в России. Таким образом, представители отечественной науки известны за рубежом, причем они способны собрать воедино достойных иностранных коллег и квалифицированно организовать тематический форум. Этот вывод важен не только для нас. Иностранные коллеги убедились, что российская наука не погибла и российских ученых можно приглашать в качестве соисполнителей в крупные европейские и международные проекты. Многие иностранные делегаты делились своим положительным впечатлением, полученным от кратких докладов и постерных сообщений российских молодых ученых. Для последних это была прекрасная школа выступлений и общения со своими сверстниками и с мировыми научными лидерами. На Конгрессе прекрасно работала секция, посвященная проблемам биохимического образования; руководители – профессора Татьяна Овчинникова и Фердинанд Хухо (Ferdinand Hucho).

Форум показал, что у российской «науки о жизни» есть бу-

дущее и она интересна миру, но при этом необходимо грамотно распорядиться имеющимися и поступающими человеческими ресурсами, приборной и реактивной базой. Статьи, бесосновательно критикующие отечественную научную школу, вредны и вызывают часто недоумение даже в среде иностранных коллег. Вместе с тем стагнация развития и недоучет необходимости участия «на уровне» в «международном разделении научного труда» недопустимы. Конгресс показал, что «точка невозврата» пройдена и у России есть будущее в области «бионауки».

### FEBS 38 И ВЛАСТЬ

Традиционно конгрессы FEBS привлекают властные структуры стран-хозяев. На открытиях выступают мэры городов, министры, депутаты. Эта имиджевая часть всегда заботит организаторов. 38-й Конгресс не стал исключением. Исторически необходимо отметить роль фонда «Сколково» в инициировании правительственных решений по Конгрессу. Виктор Вексельберг обратился от имени фонда «Сколково» в Правительство РФ с просьбой поддержать инициативу Национального комитета российских биохимиков провести конгресс в Санкт-Петербурге. Ассамблея FEBS на конкурсной основе со второго раза проголосовала за Санкт-Петербург как столицу Конгресса 2013 года. Дмитрием Медведевым было подписано Распоряжение Правительства РФ с указанием министерствам и ведомствам секторов ответственности в подготовке Конгресса. Председателем оргкомитета Конгресса был назначен Дмитрий Ливанов.

Наиболее болезненно решался вопрос с визами для иностранных делегатов. Мы понимали, что для большинства европейцев, особенно для молодежи, вопрос границ уже давно канул в Лету.

Типичным примером явился ознакомительный визит руководства молодежной секции FEBS зимой 2013 года, когда, несмотря на все наши разъяснения и визовую поддержку, один из членов делегации (Alice Verchere из Франции) прилетела в Россию без визы. Руководство FEBS требовало от России фактически безвизового режима для делегатов. Министерство иностранных дел РФ и Минобрнауки проработали, как сейчас выяснилось, оптимальный вариант оформления бесплатных виз по номерам телексных подтверждений, который работал практически без сбоев. Сейчас можно с уверенностью сказать, что, за исключением единичных случаев, все, кто хотел приехать на Конгресс, смогли это сделать. Хотелось бы отметить прекрасную работу старшего советника МИД Александра Павлушко, консулов и советников МИД Дениса Клюкина (Вашингтон), Андрея Игнатова (Страсбург), Александра Бессарабова (Париж), Константина Дорохина (Мадрид), Юрия Клименко (Барселона), Владимира Белецкого (Бонн). Министерство образования и науки и его сотрудники сыграли важную роль на разных этапах подготовки Конгресса. Неоценимую помощь оказали тогдашний заместитель министра Игорь Федюкин и быстро включившийся в процесс подготовки заместитель министра Александр Пovalко. Очень много для подготовки Конгресса сделал директор Департамента международных отношений Евгений Угринович и его заместитель Александр Сумбатян, сотрудники министерства Владимир Арбузов и Альберт Гармаш.

Принципиальный вклад в решение критических проблем внес председатель Комитета Государственной думы РФ по науке и наукоемким технологиям академик

Валерий Черешнев. Тогдашний заместитель председателя Комитета, а ныне заместитель министра Минобрнауки Людмила Огородова также способствовала разрешению ряда сложнейших ситуаций, связанных с подготовкой Конгресса. Вся тяжесть ответственности за Конгресс со стороны Российской академии наук легла на плечи вице-президента РАН академика Анатолия Григорьева, подписавшего десятки писем в министерства и ведомства и решившего ряд принципиальных проблем Конгресса.

Руководство Санкт-Петербургского научного центра РАН, Академического университета и лично академик Жорес Алфёров помогли успешно разрешить многочисленные организационные проблемы Конгресса. Без активного участия первого проректора по научной работе Академического университета чл.-корр. РАН Михаила Дубины не состоялся бы Молодежный форум. Неоценимая помощь была оказана руководством СПбГПУ в лице ректора чл.-корр. РАН Андрея Рудского, проректоров Дмитрия Райчука и Александра Речинского. Комфортное размещение участников Молодежного форума было обеспечено на территории студенческого городка СПбГПУ при самом активном содействии Виктора Игнатенко.

На всех этапах подготовки большую роль сыграл руководитель Комитета по науке и высшей школе администрации Санкт-Петербурга Андрей Максимов и его заместитель Ирина Ганус. В подготовке и реализации программы Конгресса велика роль РФФИ и лично его председателя академика Владислава Панченко. Фонд смог оказать беспрецедентную финансовую поддержку Конгрессу, а Владислав Яковлевич принял участие в открытии и лично провел заседание сес-

сии, посвященной сотрудничеству Европейской молекулярно-биологической лаборатории с фондом (EMBL–РФФИ). На начальных этапах неоценимую помощь в организации оказал член совета фонда «Сколково» Михаил Ковальчук.

Конгресс был открыт в 16 часов 6 июля вице-премьером Правительства РФ Аркадием Дворковичем, зачитавшим личное обращение к Конгрессу Председателя Правительства Российской Федерации Дмитрия Медведева. На открытии с приветственной речью к участникам и гостям Конгресса обратился губернатор Петербурга Георгий Полтавченко. Конгресс проходил в непростое для российской науки время. За несколько дней до его открытия был издан проект закона о реформе науки в России, и Конгресс сразу же превратился в площадку для бурных дискуссий. В приветственном слове вновь избранного президента РАН академика Владимира Фортова звучали слова примирения конфликтующих сторон, но страсти были накалены до предела. Член Международного консультативного совета Конгресса Нобелевский лауреат Аарон Чехановер (Aaron Ciechanover) обратился с трибуны Конгресса к Правительству РФ с просьбой разрешить конфликтную ситуацию. Многие из одиннадцати Нобелевских лауреатов, участвовавших в Конгрессе, включились в поддержку движения ученых за изменения определенных положений закона, которые, несомненно, негативно сказались бы на развитии науки в нашей стране. В своем заключительном выступлении Аркадий Дворкович заверил научную общественность, что российское правительство озабочено проблемами ученых и будет способствовать развитию науки в нашей стране. Будущее покажет...

### FEBS 38, ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И BIOTEХНОЛОГИЯ

Спор о соотношении «фундаментальной» и «прикладной» науки идет десятилетия. Разногласия эти носили «международный» характер, однако с революционным развитием биотехнологии и биофармацевтики страсти улеглись (во всяком случае, за границей). С очевидностью стало понятно, что не существует науки «второй свежести», называемой биотехнологией. В настоящее время каждое значимое открытие в биомедицинской области призвано стать основой для «прикладной» разработки. Ситуацию во многом можно сравнить с физикой прошлых лет, да и с нынешней, когда многие крупные открытия стали основой для разработок новых видов вооружения. При этом крупнейшие физики сами непосредственно принимали участие в реализации этих «прикладных» разработок.

На 38-м Конгрессе FEBS наряду с «академическими», фундаментальными симпозиумами (см. табл. 2) достаточно много внимания было уделено биомедицине, проблеме рака, аутоиммунных заболеваний, биофармацевтике. Заседание секции «Наука и общество» – председатель Жак Вейль (Jacques-Henry Weil), было полностью посвящено проблемам онкологии. В рамках Конгресса состоялась сессия фонда «Сколково», организованная вице-президентом фонда Александром Черновым и заместителем руководителя био-медкластера «Сколково» Геленой Лифшиц. Университет «Сколтех» представлял профессор Константин Северинов.

Министерство промышленности и торговли РФ выступило с инициативой провести специальную сессию по биофармацевтике. Организация заседания шла под эгидой тогдашнего директора Департамента химико-технологического комплекса

и биоинженерных технологий Минпромторга России, а ныне заместителя министра Сергея Цыбы, директора Департамента внешнеэкономических отношений Алексея Груздева. Удалось организовать очень интересную сессию. Председательствовали на ней с российской стороны академик Алексей Егоров, сопредседателем был директор департамента фармакологии Йельского университета, иностранный член РАН профессор Иосиф Шлессинджер (Joseph Schlessinger). В работе сессии приняли участие Нобелевские лауреаты Жан-Мари Лен (Jean Marie Lehn), Жюль Хоффман (Jules Hoffmann), Ада Йонат (Ada Yonath), с российской стороны выступал крупнейший специалист в области противоопухолевой терапии академик Михаил Личиницер. На заседании были рассмотрены вопросы создания новых ингибиторов протеинкиназ – потенциальных противораковых агентов.

### ВЫСТАВКА

Традиционно на конгрессах FEBS работает интересная выставка приборов и оборудования. В организации выставки Петербургского конгресса самое активное участие принимала Антонина Шувалова, коммерческий директор компании Sigma-Aldrich. Эта компания, один из генеральных спонсоров Конгресса, обеспечила пакет участника. В целом на Конгрессе в Санкт-Петербурге была представлена 41 компания. Очень интересную инициативу проявила компания АВ SCIEХ, пригнавшая в Петербург демонстрационный автобус для обучения студентов основам масс-спектрометрии. Этот автобус пользовался большим успехом у молодежи, и к радости организаторов его посетили и Нобелевские лауреаты Курт Вютрих (Kurt Wüthrich), Ада Йонат (Ada Yonath) и Роберт Хубер (Robert Huber).



Что нового узнали ученые в Петербурге на Конгрессе?

Безусловно, огромное удовольствие доставили пленарные лекции. Сусуму Тонегава (Susumu Tonegawa), получивший Нобелевскую премию за теорию перегруппировки генов иммуноглобулинов, рассказал о своих новых работах по «функциональному биоимиджингу» участков мозга. Его статья в Science вышла уже после Конгресса. Широкую палитру комбинаторной биологии нарисовал в своей пленарной лекции экспрезидент Института Скриппса профессор Ричард Лернер (Richard Lerner). Подходы к созданию новых лекарственных препаратов антипролиферативного ряда изложил Иосиф Шлессинджер (Joseph Schlessinger). Новые подходы к эволюции и происхождению жизни представил Нобелевский лауреат Джек Шостак (Jack Szostak).

### **БЕЗ КОГО КОНГРЕСС НЕ МОГ БЫ СОСТОЯТЬСЯ!**

Неоценимый вклад в подготовку программы внесли председатель и секретарь Международного консультативного совета Конгресса Нобелевский лауреат Ричард Робертс (Richard Roberts) и профессор Майкл Блэкберн (Michael Blackburn). Велика роль в разработке программы Нобелевского лауреата Роджера Корнберга (Roger Kornberg). Президентом Конгресса был академик Владимир Скула-

чев. Работа над программой велась непосредственно председателем программного комитета Сергеем Кочетковым и секретарем программного комитета Мариной Третьяк, на плечи которой легла забота обо всем лекторском корпусе. Невозможно переоценить роль секретаря Конгресса Веры Кнорре. Работа по подготовке тезисов участников была прекрасно проделана координатором Конгресса Александрой Рогольской.

Генеральный спонсор Конгресса фирма «Фармсинтез» и ее президент Дмитрий Генкин предоставили финансовую помощь и технический персонал для подготовки и проведения Конгресса, а один из главных финансовых работников компании Игорь Володин стал финансовым директором Конгресса.

Компании-операторы «Юридический форум» под руководством Ольги Мотенко и «Люмьер групп» под руководством Екатерины Ивановой успешно осуществили весь комплекс мероприятий делегат-менеджмента и организации Конгресса, а «Ленэкспо» под руководством Сергея Воронкова провело застройку павильонов.

С самых первых дней организации Конгресса и до последних его минут роль компании «Парк-медиа» и лично Александра Гордеева и Константина Киселева, взявших на себя ответственность по регистрации участников и поддержке сайта, невозможно переоценить.

### **СТОИТ ЛИ РОССИИ И В ДАЛЬНЕЙШЕМ БОРЬБЫ ЗА ПРАВО ПРОВЕДЕНИЯ БОЛЬШИХ НАУЧНЫХ КОНГРЕССОВ**

Россия обречена жить в научном сообществе, и лишь активное участие российских ученых в международных знаковых форумах поможет нашей стране отстаивать свои позиции. Безусловно, некоторые знаковые научные мероприятия надо проводить и у себя дома.

### **КАК НАУЧНЫЕ ОБЩЕСТВА, РАБОТАВШИЕ ПОД ЭГИДОЙ РАН, БУДУТ ЖИТЬ В ЭПОХУ ФАНО**

Большинство крупных конгрессов проводится под эгидой научных обществ. В России эти общества работали раньше как единое целое, входя в стройную систему Российской академии наук. Что будет теперь? Кто будет платить за них взносы в международные научные организации? Не останутся ли российские научные общества с богатой историей на обочине перестроенных процессов? С этими вопросами необходимо будет разбираться новому руководству Академии и ФАНО. ●

**А.Г. Габибов,**  
член-корреспондент РАН,  
профессор,  
главный редактор журнала  
Acta Naturae

ФОРУМ









УДК 576+602.9:575.224:575.16

# Феномен «эпигенетической памяти» индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Е. А. Васькова<sup>1,2,3</sup>, А. Е. Стеклёнова<sup>1,2,3</sup>, С. П. Медведев<sup>1,2,3</sup>, С. М. Закиан<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10<sup>2</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

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

Поступила в редакцию 27.05.2013

**РЕФЕРАТ** Современная биомедицина и фармакология требуют создания новых, более совершенных клеточных моделей заболеваний. Одним из перспективных направлений в данной области является применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), получаемых путем репрограммирования соматических клеток. Однако для полноценного использования данной технологии необходимо тщательное изучение ИПСК на молекулярном, эпигенетическом и функциональном уровнях. Современные методы анализа свидетельствуют о том, что ИПСК очень схожи с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) по профилю экспрессии белоккодирующих генов, генов микроРНК, метилированию ДНК, спектру и паттерну распределения ковалентных модификаций гистонов. Тем не менее показано, что ИПСК обладают характерными особенностями, приобретенными как в процессе репрограммирования, так и в результате сохранения ряда черт эпигеномов и транскриптомов исходных соматических клеток-предшественников. Явление сохранения черт эпигеномов и транскриптомов исходных соматических клеток получило название «эпигенетическая память». Данный обзор посвящен явлению «эпигенетической памяти» в контексте процесса репрограммирования, влиянию «памяти» на свойства ИПСК, а также возможности ее использования в клеточных технологиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** плюрипотентность, репрограммирование, эпигенетика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ДМР – дифференциально метилированные районы.

## ВВЕДЕНИЕ

Любой тип клеток в организме характеризуется своим собственным индивидуальным эпигеномом: определенным спектром и паттерном посттрансляционных ковалентных модификаций гистонов, метилирования ДНК, наличием набора малых некодирующих РНК. Комбинация данных факторов формирует уникальную структуру хроматина, присущую клеткам того или иного типа.

Хроматин плюрипотентных клеток характеризуется «открытой» конфигурацией и декомпактизованным состоянием [1, 2]. Хроматин в такой конфигурации в процессе дифференцировки и специализации клеток способен быстро подвергаться различным посттрансляционным модификациям гистонов, процессам метилирования и деметилирования ДНК [3, 4]. Плюрипотентные клетки содержат также «бивалентные домены», т.е. области, обогащенные одновременно

метками и активного, и неактивного хроматина. Большинство бивалентных доменов ассоциированы с точками старта транскрипции генов, вовлеченных в развитие. Так, например, бивалентные домены найдены в генах раннего развития (*Sox1*, *Pax3*, *Msx1*, *Irx3*) мыши. В плюрипотентных клетках эти гены характеризуются низким уровнем транскрипции, тогда как в ходе дифференцировки бивалентные домены преобразуются в моновалентные, содержащие метки либо активного, либо неактивного хроматина, и соответственно наблюдается активация или репрессия генов, обуславливающая специализацию клеток конкретного типа [1].

На сегодняшний день известно два типа плюрипотентных клеток, имеющих широкий потенциал применения в биомедицине: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). ИПСК получают из соматических

тических клеток путем эктопической сверхэкспрессии генов определенного набора факторов транскрипции, таких, как *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* и *Lin28* или микроРНК [5–8]. В области биомедицины именно внедрение ИПСК представляется наиболее стратегически выгодным, поскольку они могут быть получены из соматических клеток различного происхождения (фибробласты кожи, кератиноциты, стволовые клетки жировой ткани, клетки периферической крови и др.) в любой период жизни человека и являются аутологичными по отношению к донору соматических клеток. Поэтому детальное широко-масштабное изучение свойств ИПСК и возможностей их клинического применения представляет крайне актуальную задачу.

На сегодняшний день известно, что ИПСК по своим свойствам очень схожи с ЭСК, т.е. экспрессируют сходный спектр генов, формируют тератомы, содержащие производные всех трех зародышевых листков. ИПСК мыши обладают способностью формировать химеры и образовывать полноценный организм при тетраплоидной комплементации [9]. В то же время во множестве работ получены свидетельства того, что в результате репрограммирования линии ИПСК приобретают целый ряд генетических и эпигенетических aberrаций, включая нарушения в работе импринтированных генов, изменения в количестве копий генов, точечные мутации, aberrантный паттерн метилирования ДНК и ряд других [10–14]. При этом отличия в эпигеномах и транскриптомах ЭСК и ИПСК обусловлены не только aberrациями, приобретенными в процессе репрограммирования, но и сохранением ряда эпигенетических меток исходных соматических клеток. Подобное наследование свойств эпигеномов и транскриптомов в ИПСК от исходных соматических клеток получило название «эпигенетическая память» [15–17].

В представленном обзоре рассмотрены, главным образом, идентичность эпигеномов и транскриптомов ИПСК и исходных соматических клеток-предшественников, влияние феномена «эпигенетической памяти» на свойства ИПСК и возможности его практического использования в области биомедицины.

### **ФЕНОМЕН «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» В ПРОЦЕССЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ**

С помощью современных высокопроизводительных методов анализа показано, что по профилю экспрессии генов, спектру и паттерну распределения ковалентных модификаций гистонов, метилированию ДНК, экспрессии микроРНК ИПСК очень схо-

жи с ЭСК. Однако в транскриптомах и эпигеномах этих клеток существуют минимальные различия. Так, за последнее время опубликована серия работ, посвященных различиям в паттерне метилирования ДНК независимых линий ИПСК. Наиболее изучено метилирование ДНК по остаткам цитозина в CpG-динуклеотидах [18]. В геноме CpG-динуклеотиды могут локализоваться как по отдельности, так и концентрироваться в определенных районах, называемых CpG-островками. Как правило, CpG-островки находятся вблизи промоторов генов, а высокий уровень метилирования промоторов коррелирует с репрессией генов [19].

В работе К. Kim и соавт. [16] изучен паттерн метилирования ДНК в ЭСК и в ИПСК из двух различных исходных типов соматических клеток: из клеток крови и фибробластов проксимальной части хвоста мышей. Анализ проведен с применением ДНК-микрочипов. Данный подход позволил оценить метилирование ~4.6 млн CpG-динуклеотидов, что включает практически все CpG-островки и близлежащие участки, но не учитывает не-CpG-метилирование. По сравнению с ЭСК в ИПСК, полученных из клеток кожи, выявлено 3349 дифференциально метилированных районов (ДМР), тогда как в ИПСК из клеток крови – всего 516. Интересно, что биоинформатический анализ 24 наиболее выраженных ДМР показал, что данные районы ассоциированы с генами, вовлеченными в процесс гемопоэза (11 генов) и остеогенеза (3 гена). Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что при репрограммировании ИПСК недорепрограммированными остаются те гены, которые исходно отвечали за специализацию клетки.

Показано, что в ИПСК, полученных из клеток-предшественников скелетной мускулатуры мыши, на значительном уровне сохраняется экспрессия маркеров клеток скелетной мускулатуры *Cxcr4* и *Integrin B1*, а в ИПСК из гранулоцитов – маркеров гранулоцитов (*Lysozyme* и *Gr-1*). Сравнение транскрипционного профиля двух линий ИПСК выявило 1388 дифференциально экспрессирующихся генов. При этом биоинформатический анализ 100 генов, уровень экспрессии которых различался наиболее значительно, выделяет группы генов, участвующих в формировании миофибрилл, сократительных волокон, в развитии мускулатуры, активации β-клеток и лейкоцитов [17]. Таким образом, эти результаты также говорят о том, что ИПСК обладают «эпигенетической памятью», что проявляется в сохранении ряда черт эпигеномов и транскриптомов соматических клеток исходного типа.

Сходное явление описано и для ИПСК человека. В одной из работ [20] проведен сравнительный

анализ метилирования ДНК в 5 линиях ЭСК человека, 22 линиях ИПСК и 6 исходных линиях соматических клеток. В качестве соматических клеток-предшественников использованы эмбриональные фибробласты легкого, клетки амниона, эндометрия, эпителия пупочной вены, менструальной крови, а также фибробласты кожи. Анализ метилирования был проведен с помощью ДНК-микрочипов, содержащих пробы на 24273 CpG-сайтах в пределах 13728 генов. Оказалось, что паттерн метилирования ~90% CpG-сайтов (17572 сайта) не отличается в ЭСК, ИПСК и в исходных соматических клетках, т.е., согласно этим данным, лишь 10% CpG-сайтов подвергаются модификации и обеспечивают эпигенетическую вариабельность между различными типами клеток. Сравнение плюрипотентных (ЭСК, ИПСК) и исходных соматических клеток выявило 220 ДМР, из которых 174 ДМР (79.5%) гиперметилированы в ЭСК и ИПСК. Эти районы ассоциированы, главным образом, с генами регуляции транскрипции. Интересно, что большинство гипометилированных ДМР локализируются в CpG-островках, тогда как большинство гиперметилированных ДМР находятся вне CpG-островков. Сравнение метилирования ДНК в ЭСК и ИПСК показало, что число ДМР варьирует от линии к линии. В целом при наличии ДМР, хотя бы в одной из исследуемых линий ИПСК, обнаружено 1459 ДМР в пределах 1260 генов. Стоит особо отметить, что данное число ДМР представлено совокупностью, во-первых, сайтов, аберрантно метилированных *de novo*, и, во-вторых, сайтов, унаследованных от соматических клеток исходного типа [20].

Изучено также метилирование ДНК в ЭСК человека и ИПСК, полученных из клеток неонатальной пуповинной крови (от двух независимых доноров) и кератиноцитов крайней плоти (от трех независимых доноров) [21]. С помощью ДНК-микрочипа, включающего 5.2 млн CpG-сайтов, что охватывает фактически все CpG-островки и близлежащие последовательности, как и в других работах, показано, что паттерн ДНК-метилирования в различных линиях ИПСК отличается. Причем из 370 ДМР 267 приобретены *de novo* в результате репрограммирования, а 75 унаследованы в результате «эпигенетической памяти» [21].

Описанные работы [20, 21] выполнены с использованием ДНК-микрочипов, позволяющих оценить ДНК-метилирование в масштабе генома. Однако современные методы молекулярно-генетического анализа дают возможность изучать эпигеном клетки с гораздо более высокой точностью и разрешением. В качестве примера можно привести исследование R. Lister и др. [22], в котором с помощью высокочувствительного метода MethylC-Seq проведен сравнительный анализ метилома ряда линий ИПСК, полученных с использованием

разных подходов из соматических клеток различного типа. Данный метод позволяет оценить метилирование остатков цитозина на уровне всего генома с разрешением в один нуклеотид. Исследованы ИПСК, полученные из адипоцитов путем трансдукции ретровирусами, несущими кДНК генов *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *MYC*; ИПСК, полученные путем трансдукции лентивирусами, несущими кДНК генов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28*, фибробластов легкого IMR90; и три линии ИПСК, полученные из фибробластов крайней плоти с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов. Оценен статус метилирования 75.7–94.5% остатков цитозина во всех исследуемых линиях. Причем в рассмотренной работе [22] оценен статус метилирования не только цитозинов в составе CpG-динуклеотидов, но также и в не-CpG-динуклеотидах (mCH, где H = A, C или T). Показано, что паттерн метилирования цитозинов в составе CpG-динуклеотидов в ЭСК и ИПСК характеризуется высоким уровнем сходства, тем не менее, выявлено 1175 ДМР. Длина индивидуальных ДМР варьировала в пределах 1–11 т.п.н. и в совокупности составила 1.68 млн п.н. Распределение ДМР по геному также неоднородно: большинство (80%) ДМР ассоциированы с CG-островками, 62% расположены возле или внутри генов и 29 и 19% выявлены в пределах 2 т.п.н. от точек старта или терминации транскрипции соответственно. Важно отметить, что, несмотря на вариабельность количества и локализации ДМР в различных линиях ИПСК, была выделена группа ДМР, совпавших во всех исследуемых линиях. Это говорит о том, что в геноме существуют «горячие точки», не подвергающиеся эпигенетическому репрограммированию. Функции и значение этих районов пока мало изучены и нуждаются в дополнительном анализе.

Анализ метилирования в не-CpG-динуклеотидах показал также, что, несмотря на значительное сходство в общем паттерне метилирования между ЭСК и ИПСК в масштабе генома, существуют различия и в не-CpG-метилировании. Всего детектировано 29 не-CpG-ДМР, имеющих ряд отличительных особенностей [22]. Во-первых, не-CpG-ДМР характеризуются значительной протяженностью. Длина более половины ДМР составляет более 1 млн п.н. и в целом общая длина 29 ДМР – 32.4 млн п.н. Кроме того, по локализации в геноме не-CpG-ДМР отличаются от локализации CpG-метилирования: основная их часть сосредоточена в районах центромер и теломер [22]. Интересно, что в работах K. Nishino и др., R. Lister и др. [20, 22] выявлены 72 промотора генов, которые подвергаются дифференциальному метилированию в обоих исследованиях.

С использованием ДНК-микрочипов сравнили профиль ДНК-метилирования в пяти образцах ме-



зехимных стромальных клеток, восьми различных линиях ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток, и трех линиях ЭСК человека и подробно проанализировали локализацию и динамику метилирования CpG в геноме [23]. В среднем по геному метилированы 17 CpG-сайтов в гене. Средний уровень метилирования всех CpG-сайтов составил 49.4, 70.6 и 70.5% в мезенхимных стромальных клетках, в ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток, и ЭСК соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе репрограммирования наблюдается тенденция к модификации полуметилированных районов в полностью метилированные. Всего 185246 CpG-сайтов оказались дифференциально метилированными, из которых 33941 подвергаются деметилированию, тогда как 151306 становятся гиперметилированными в ИПСК. По локализации в геноме все CpG-сайты классифицировали на следующие группы: CpG-сайты, расположенные в районе 1500 или 200 п.н. выше точки начала транскрипции, CpG-сайты в 5'-нетранслируемых областях, в первом экзоне, в 3'-нетранслируемых областях генов и в межгенных районах [24]. Показано, что в среднем уровень метилирования в процессе репрограммирования возрастает во всех районах, однако в области промоторов и первых экзонов уровень метилирования снижается. При этом сайты, которые подвергаются гипо- и гиперметилированию, преимущественно локализуются в межгенных районах. Проведен также анализ метилирования в контексте CpG-островков в следующих областях: 2 т.п.н. выше или ниже CpG-островка («shore region»), районы размером 2 т.п.н., фланкирующие «shore region» («shelf region»). Все остальные CpG-сайты были объединены в районы «open sea». В мезенхимных стромальных клетках средний уровень метилирования в CpG-островках был гораздо ниже (22.2%), чем в «shore region» (67.5%), в «shelf region» (42.7%) и в «open sea» (61.8%) [24]. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения в паттерне метилирования ДНК, ассоциированные с процессом репрограммирования, происходят, главным образом, в районах, расположенных вне CpG-островков.

Между ЭСК и ИПСК выявлено 3744 ДМР, из них 3134 CpG-сайта были гипометилированы и 610 – гиперметилированы в ИПСК по сравнению с ЭСК [24]. Интересно, что гиперметилированные CpG-сайты в ЭСК локализуются преимущественно в пределах 200 п.н. от точек начала транскрипции, в первом экзоне генов и межгенных районах, тогда как в ИПСК – в 1500 п.н. выше точки начала транскрипции и в межгенных районах. Биоинформатический анализ показал, что 610 CpG-сайтов, гиперметилированных в ИПСК, ассоциированы с генами, участвующими

в процессах кератинизации и дифференцировки кератиноцитов, а также в дифференцировке эпидермальных клеток и развитии эпидермиса.

Таким образом, профиль метилирования в ИПСК и ЭСК также различается: районы с высоким уровнем метилирования в ЭСК локализованы преимущественно в проксимальных районах промоторов генов, в ИПСК – в дистальных районах промоторов, межгенных и «open sea» районах, в генах, участвующих в развитии эпидермиса.

Интересно, что выявлена закономерность распределения ДМР и на хромосомном уровне. Замечено, что в ИПСК с набором половых хромосом XX число ДМР, локализованных на X-хромосоме, значительно выше, чем в ИПСК с набором хромосом XY [20].

Таким образом, в результате репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию образуются ДМР, число которых варьирует в зависимости от исходного типа клеток, метода репрограммирования, условий культивирования и т.д. Основная часть таких ДМР возникает в результате aberrантного метилирования *de novo*, а меньшая часть является следствием «эпигенетической памяти». Стоит также отметить, что возникновение ДМР в результате «эпигенетической памяти» обусловлено не только исходным типом соматических клеток, но и индивидуальными особенностями паттерна метилирования ДНК у отдельных индивидов – доноров клеток. Известно, что индивидуальные особенности в эпигеномах клеток обнаружены даже у однозиготных близнецов [23]. Показано, что некоторая часть таких донор-специфичных эпигенетических модификаций не изменяется в процессе репрограммирования. Например, сравнительный анализ профиля метилирования ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток от пяти различных доноров, выявил 1129 дифференциально метилированных CpG-сайтов. Эти сайты связаны главным образом с генами, вовлеченными в процессинг и презентацию антигенов. Донор-специфичные ДМР локализованы в основном в телах генов, 3'-нетранслируемых и межгенных районах [24].

В сохранении ряда эпигенетических меток соматических клеток исходного типа, помимо метилирования CpG-динуклеотидов, принимают участие также и ковалентные модификации гистонов. Так, например, показано, что в ИПСК, полученных из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы человека, фактор транскрипции PDX1 не подвергается репрессии в результате репрограммирования. Методом иммунопреципитации хроматина установлено, что ацетилованная форма гистона H3, ассоциированная с транскрипционно активным хроматином, сохраняется в промоторах генов, кодирующих инсулин и PDX1 [15].

Таким образом, широкопрофильные полногеномные исследования показали, что хотя ЭСК и ИПСК очень схожи между собой, но тем не менее существуют минимальные различия в паттерне метилирования ДНК, экспрессии генов и ковалентных модификациях гистонов в этих клетках. Одним из наиболее актуальных вопросов остается влияние этих различий на свойства и качество ИПСК.

### **ВЛИЯНИЕ «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» НА СВОЙСТВА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Наследование ряда черт эпигеномов и транскриптомов клеток исходного типа затрагивает лишь небольшой набор генов. Степень влияния aberrантной регуляции этих генов на свойства получаемых ИПСК активно изучается. Установлено, что ДМР, унаследованные в результате «эпигенетической памяти», приводят к сдвигу спектра дифференцировки, т.е. наблюдается преимущественная дифференцировка линий ИПСК в направлении соматических клеток исходного типа. Так, например, показано, что ИПСК мыши, полученные из клеток крови и кожи, обладают различным потенциалом дифференцироваться в гемопоэтическом и остеогенном направлениях соответственно. ИПСК, полученные из клеток крови, имели большее сродство к образованию гемопоэтических колоний, тогда как ИПСК из клеток кожи сформировали большее число колоний при дифференцировке в остеогенном направлении [16]. Оценивали также потенциал дифференцировки ИПСК человека, полученных из клеток неонатальной пуповинной крови и кератиноцитов крайней плоти [21]. В эмбрионидных тельцах на 6-й день культивирования определили уровень экспрессии гена кератина-14 – раннего маркера дифференцировки. В ИПСК, полученных из кератиноцитов, экспрессия данного гена была в 9.4 раза выше, что говорит о гораздо большем потенциале дифференцировки данных клеток в сторону кератиноцитов, чем у ИПСК из клеток пуповинной крови. Это свойство справедливо и в обратном направлении: ИПСК, полученные из клеток пуповинной крови, со значимо большей эффективностью дифференцировались в гемопоэтическом направлении [21].

Наличие «эпигенетической памяти» также может приводить к серьезным последствиям при использовании ИПСК для работ *in vivo*. Так, M. Stadtfeld и др. [25] исследовали ИПСК мыши, полученные из различных соматических клеток-предшественников: гемопоэтических стволовых клеток (11 линий), предшественников клеток гранулоцитарно-макрофагального ряда (11 линий), гранулоцитов (9 линий), перитонеальных фибробластов (6 линий), фибробластов хвоста (6 линий) и кератиноцитов (6 линий). В резуль-

тате клетки большинства линий не были способны эффективно образовывать химеры и формировать полноценный организм при тетраплоидной комплементации. Сравнение ЭСК и ИПСК на уровне мРНК показало, что в большинстве клонов ИПСК, как и в исходных линиях соматических клеток, и в отличие от ЭСК, репрессированы импринтированные гены – *Gtl2* (или *Meg3*) и *Rian* локуса *Dlk1-Dio3*, расположенного у мыши в районе 12qF1. Известно, что гены данного локуса принимают участие в процессах роста и дифференцировки некоторых тканей, постнатальных неврологических и метаболических процессах [26]. Полногеномный анализ профиля экспрессии микроРНК в ЭСК и ИПСК показал, что из 336 микроРНК 21 (6.3%) по-разному экспрессируются в ЭСК и ИПСК. Причем все эти микроРНК экспрессируются с хромосомы 12qF1 и репрессированы в ИПСК. Методом иммунопреципитации хроматина показано, что в локусе *Dlk1-Dio3* в ИПСК значительно снижен уровень ацетилирования гистонов H3 и H4 и метилированной формы H3K4, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином [25].

Стоит также отметить, что наследование эпигенетического и транскрипционного статуса исходных соматических линий наблюдается не у всех импринтированных генов. С помощью количественной ПЦР показано, что экспрессия других импринтированных генов в ИПСК носит клоносpezifичный характер [16]. Этот факт подтверждается результатами другой работы, в которой ИПСК получали из нейтральных стволовых клеток, выделенных от партеногенетического эмбриона мыши. С использованием микрочипов показано, что в этих клетках уровень экспрессии генов с отцовским импринтингом – *Peg1* (или *Mest*), *Ndn* и *Snurf*, значительно снижен по сравнению с соматическими клетками, полученными из эмбрионов после естественного оплодотворения. В результате процесса репрограммирования данные гены подвергаются реактивации [27].

Таким образом, феномен «эпигенетической памяти» оказывает значительное влияние на свойства ИПСК и может приводить к серьезным последствиям. Соответственно при использовании ИПСК в моделировании заболеваний и в области регенеративной клеточной медицины данный аспект требует дополнительного внимания.

### **ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ЭПИГЕНОМ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Минимальные отличия в эпигеномах и транскриптомах, образующиеся в результате «эпигенетической памяти» и/или aberrантного метилирования *de novo*

в ИПСК и в ЭСК, могут приводить к довольно существенным изменениям их свойств. В связи с этим возникает вполне закономерный вопрос о том, какие факторы влияют на характер и число таких различий и возможно ли искусственно создать условия для корректировки подобных эффектов.

В первую очередь стоит отметить, что на качество ИПСК в целом и на число «эпигенетических меток» в частности влияют условия и длительность культивирования. Репрограммирование – процесс постепенный, и изменение транскриптома и эпигенома клетки также требует определенного количества раундов репликации и митотических делений и, следовательно, числа пассажей. Показано, что с увеличением числа пассажей происходит если не полное нивелирование эпигенетических различий, то значительное снижение их числа. Так, например, в 12 независимых линиях ИПСК мыши, полученных из клеток разного типа ( $\beta$ -клеток, фибробластов, Т-клеток, гранулоцитов), на ранних пассажах число дифференциально экспрессирующихся генов составляло от 500 до 2000 в зависимости от линии, и за 14 пассажей это число сократилось примерно до 50, а в некоторых линиях даже до нуля [17]. Исчезновение различий между линиями ИПСК коррелировало с появлением бивалентных доменов: накоплением триметилированного H3K4 (метка активного хроматина) и триметилированного H3K27 (метка неактивного хроматина), характерных для плюрипотентных клеток [17]. Изучение паттерна метилирования 7 независимых линий ИПСК человека также показало, что число ДМР в них значительно сократилось: так, на ранних пассажах число ДМР варьировало в различных линиях от 80 до 256, тогда как на 30–40 пассажах – от 30 до 70 [20]. Сокращение числа ДМР приводит к возрастанию способности клеток давать при дифференцировке производные всех трех зародышевых листков с одинаковой эффективностью. Так, например, ИПСК, полученные из кератиноцитов, в ходе дифференцировки с очень низкой эффективностью формировали колонии кроветворных клеток, что обусловлено остаточным метилированием генов, вовлеченных в гемопоэз, как, например, ген *HOXD8*. В кератиноцитах и вследствие «эпигенетической памяти» в полученных из них линиях ИПСК ген *HOXD8* значительно метилирован, тогда как в процессе культивирования ИПСК уровень метилирования гена *HOXD8* снижается и параллельно увеличивается способность клеток к гемопоэтической дифференцировке. Однако такой эффект отмечен лишь для одного из двух исследуемых клонов. Таким образом, продолжительное культивирование ИПСК способно, по-видимому, влиять на определенные локусы генома, но это справедливо не для всего генома и всех линий ИПСК [21].

Существуют две гипотезы, объясняющие элиминирование молекулярных и функциональных различий клонов ИПСК в процессе культивирования. Один из возможных механизмов – пассивная утрата соматических маркеров, ассоциированная с процессом репликации ДНК. Альтернативным вариантом является селекция клонов в процессе культивирования, направленная на поддержание клонов с меньшим числом черт исходных клеток. Тем не менее целый ряд наблюдений свидетельствует против селекции. Так, ИПСК на ранних и более поздних пассажах имеют одинаковый уровень пролиферации и одинаковые темпы роста клонов, происходящих из одной клетки. Также число пассажей (т.е. необходимое число раундов репликации), необходимых культуре для элиминирования молекулярных и эпигенетических различий между клонами, зависит от исходного типа соматических клеток [17].

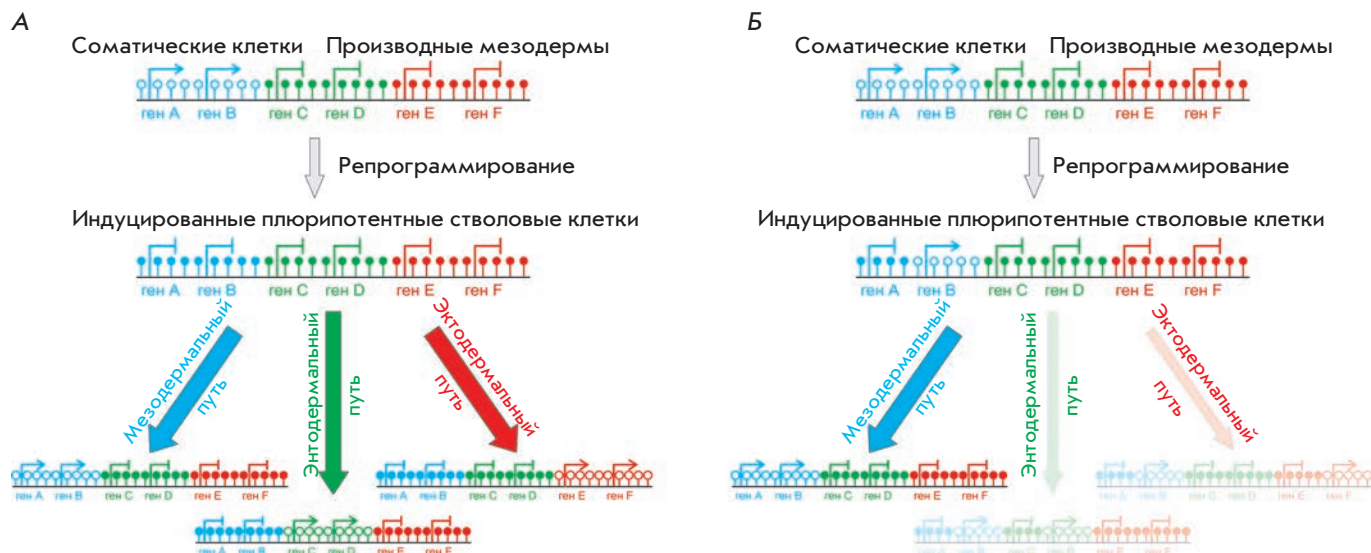
В то же время получены данные, свидетельствующие о том, что в процессе культивирования число ДМР не сокращается. Так, например, метиломный анализ линий ИПСК на ранних (~15) и на поздних пассажах (~65) не выявил изменения числа ДМР [22].

Другой возможный фактор, который может повлиять на число ДМР в ИПСК, – условия культивирования (состав сред, концентрация  $O_2$ ,  $CO_2$  и т.д.) и/или использование дополнительных химических агентов. Так, показано, что, используя оптимальные условия, можно значительно повысить «качество» ИПСК. Например, использование при получении ИПСК мыши среды, содержащей вместо эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота заменитель сыворотки или смесь эмбриональной сыворотки и заменителя, приводило к увеличению выхода клонов, в которых реактивировался импринтированный ген *Meg3* из локуса *Dlk1-Dio3* [28].

Различные химические агенты также влияют на экспрессию генов. Например, обработка ИПСК мыши трихостатином (ингибитор гистондеацетилаз) и 5-азациитидином (ингибитор ДНК-метилаз) приводит к изменениям эпигенома [16]. Обработка вальпроевой кислотой (ингибитор гистондеацетилаз) клонов ИПСК мыши, в которых репрессирован импринтированный локус *Dlk1-Dio3*, привела в ряде линий к реактивации генов данного локуса. Такие ИПСК были способны давать вклад в развитие организма при тетраплоидной комплементации [25].

Показано, что аскорбиновая кислота (витамин С) также влияет на паттерн метилирования ДНК [29]. Так, в ИПСК, культивируемых с добавлением в среду аскорбиновой кислоты, в зависимости от ее дозы, наблюдалась реактивация импринтированного гена *Meg3* локуса *Dlk1-Dio3*. Однако аскорбиновая кис-





Феномен «эпигенетической памяти» в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках. **А** – «идеальная» картина процесса репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию, когда индуцированные плюрипотентные стволовые клетки полностью плюрипотентны, и дифференцировка во все три зародышевых листка является равновероятным событием. **Б** – в результате репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию клетки могут сохранять ряд черт эпигенома предкового типа. Такой феномен приводит к преимущественной дифференцировке ИПСК в направлении соматических клеток исходного типа

лота не приводит к масштабному деметилированию всего генома: она в состоянии только предотвратить aberrantное метилирование локуса *Dlk1-Dio3* в процессе репрограммирования, но не способна привести к деметилированию ДНК в уже стабильных клонах ИПСК [28].

В то же время способность клеток к дифференцировке в определенном направлении и профиль метилирования можно восстановить путем повторных раундов репрограммирования. Показано, что, например, ИПСК, полученные из клеток-предшественников нейрального ряда, обладали очень низкой способностью формировать колонии гемопоэтических клеток. Но когда такие колонии подвергались репрограммированию, то формирование гемопоэтических колоний «вторичными» ИПСК значительно возросло [16].

Таким образом, варьируя систему репрограммирования, условия культивирования, добавление или удаление химических агентов, длительность культивирования, можно получить ИПСК, максимально приближенные по своим свойствам к «стандарту» – ЭСК. Однако в любом варианте сохраняются минимальные отличия в транскриптомах и эпигеномах этих клеток. Является ли данный фактор преградой на пути к практическому применению ИПСК? Этот вопрос в настоящее время активно обсуждается.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕНОМЕНА «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» В БИМЕДИЦИНЕ

Современная биомедицина и фармакология требуют создания новых, более совершенных модельных систем заболеваний. Эти модели должны соответствовать определенному набору критериев: воспроизводимости, доступности, простоте использования, однозначности трактовки получаемых результатов, способности адекватного переноса, т.е. трансляции результатов, полученных в фундаментальных исследованиях, в область практического применения в медицине [30–33].

Современный массив исследований в данной области показал, что использование ИПСК является одним из наиболее перспективных подходов. Однако при создании моделей заболеваний человека на основе ИПСК необходимо учитывать все факторы, способные повлиять на качество получаемых данных. Один из таких значимых факторов – «эпигенетическая память». Является ли этот феномен недостатком или преимуществом моделей на основе ИПСК? На сегодняшний день этот вопрос остается открытым. Чтобы попытаться ответить на него, рассмотрим проблемы современной биомедицины с точки зрения использования ИПСК.

В области заместительной клеточной терапии актуально наличие в достаточном количестве опреде-

ленного клеточного материала, пригодного для работы. Эта проблема носит множественный характер. Во-первых, это доступность исходных донорских клеток, поскольку для большого числа типов клеток затруднительным представляется получение биоптатов, например, для различных типов нейронов или эпителия внутренних органов. Во-вторых, это проблема количества материала. Количество получаемого материала ограничено даже при возможности проведения биопсии, более того, клетки, как правило, терминально дифференцированы, а значит, обладают ограниченной пролиферативной активностью. Это приводит к тому, что стандартных методов недостаточно для проведения всех необходимых манипуляций и анализов в полном объеме. Данную проблему можно решить с помощью ИПСК, получаемых из ограниченного количества биоптата. ИПСК обладают неограниченным потенциалом пролиферации, поэтому их можно неоднократно подвергать дифференцировке в клетки нужного типа, что создаст неисчерпаемый источник клеток для проведения всех необходимых анализов и манипуляций.

Кроме того, возникает проблема корректной и эффективной дифференцировки ИПСК в клетки необходимого типа. На сегодняшний день, несмотря на обильный массив знаний о сигнальных путях и факторах транскрипции, связанных с развитием по тому или иному пути, лишь для ограниченного количества типов клеточных культур разработаны протоколы направленной дифференцировки. Таким образом, даже при наличии линий ИПСК не всегда существует возможность получения конкретного, узкоспециализированного типа клеток. В решении этой проблемы можно использовать феномен «эпигенетической памяти». На основании высокопроизводительных анализов, направленных на изучение «эпигенетической памяти», мы предлагаем следующую

схему использования данного феномена в области заместительной клеточной терапии (*рисунок*). Известно, что в результате сохранения ряда черт эпигеномов и транскриптомов исходного типа клеток ИПСК имеют склонность дифференцироваться в направлении происхождения соматических клеток исходного типа. Соответственно для получения дифференцированных производных определенного типа клеток целесообразно использовать биоптатный материал из клеток того же происхождения. При этом необходимо учесть ряд моментов: во-первых, число клонов ИПСК для анализа должно быть не менее десяти, что позволит, при наличии вариативности между клонами, выбрать наиболее оптимальные. Во-вторых, путем сравнения совокупности данных транскриптомного и метиломного анализа с имеющимися базами данных нужно решить, произошла ли в результате репрограммирования реактивация генов, образующих так называемые «горячие точки» недорепрограммирования, выявить спектр генов, эпигенетические метки которых унаследованы от соматических клеток предкового типа. Наконец, изучение на функциональном уровне генов, подверженных влиянию «эпигенетической памяти», позволит предсказать направление дифференцировки клеток, а при использовании специальных условий направить процесс дифференцировки по определенному пути. Таким образом, на данном примере мы показываем, что недостатки ИПСК в виде неполного репрограммирования, а именно наследования ряда черт эпигеномов и транскриптомов, можно перевести в преимущества. ●

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8264) и РФФИ (гранты № 11-04-00847-а, 12-04-00185-а и 12-04-00208-а).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 315–326.
- Spivakov M., Fisher A.G. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 263–271.
- Bibikova M., Chudin E., Wu B., Zhou L., Garcia E.W., Liu Y., Shin S., Plaia T.W., Auerbach J.M., Arking D.E., et al. // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 9. P. 1075–1083.
- Doi A., Park I.H., Wen B., Murakami P., Aryee M.J., Irizarry R., Herb B., Ladd-Acosta C., Rho J., Loewer S., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 12. P. 1350–1353.
- Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 3. P. 340–345.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al. // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.L., Ma Q.W., Wang L., et al. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 86–90.
- Pick M., Stelzer Y., Bar-Nur O., Mayshar Y., Eden A., Benvenisty N. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 11. P. 2686–2690.
- Hussein S.M., Batada N.N., Vuoristo S., Ching R.W., Autio R., Narva E., Ng S., Sourour M., Hamalainen R., Olsson C., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7336. P. 58–62.
- Ben-David U., Benvenisty N., Mayshar Y. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 23. P. 4603–4604.
- Martins-Taylor K., Xu R.H. // *Stem Cells*. 2011. V. 30. № 1. P. 22–27.
- Sun B., Ito M., Mendjan S., Ito Y., Brons I.G., Murrell A., Vallier L., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A. // *Stem Cells*. 2011. V. 30. № 2. P. 161–168.

15. Bar-Nur O., Russ H.A., Efrat S., Benvenisty N. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 1. P. 17–23.
16. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.L., et al. // *Nature*. 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
17. Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 848–855.
18. Adams R.L. // *Biochem J*. 1990. V. 265. № 2. P. 309–320.
19. Trowbridge J.J., Orkin S.H. // *Epigenetics*. 2010. V. 5. № 3. P. 189–193.
20. Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H., Umezawa A. // *PLoS Genet*. 2011. V. 7. № 5. P. e1002085.
21. Kim K., Zhao R., Doi A., Ng K., Unternaehrer J., Cahan P., Hongguang H., Loh Y.H., Aryee M.J., Lensch M.W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 12. P. 1117–1119.
22. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7336. P. 68–73.
23. Kaminsky Z.A., Tang T., Wang S.C., Ptak C., Oh G.H., Wong A.H., Feldcamp L.A., Virtanen C., Halfvarson J., Tysk C., et al. // *Nat. Genet*. 2009. V. 41. № 2. P. 240–245.
24. Shao K., Koch C., Gupta M.K., Lin Q., Lenz M., Laufs S., Denecke B., Schmidt M., Linke M., Hennies H.C., et al. // *Mol. Ther.* 2012. V. 21. № 1. P. 240–250.
25. Stadtfeld M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 175–181.
26. da Rocha S.T., Edwards C.A., Ito M., Ogata T., Ferguson-Smith A.C. // *Trends Genet*. 2008. V. 24. № 6. P. 306–316.
27. Kim M.J., Choi H.W., Jang H.J., Chung H.M., Arauzo-Bravo M.J., Scholer H.R., Tae Do J. // *J. Cell Sci*. 2012. V. 126. № 11. P. 2516–2524.
28. Stadtfeld M., Apostolou E., Ferrari F., Choi J., Walsh R.M., Chen T., Ooi S.S., Kim S.Y., Bestor T.H., Shioda T., et al. // *Nat. Genet*. 2012. V. 44. № 4. P. 398–405.
29. Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L., Esteban M.A., Pan G., et al. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 6. P. 575–587.
30. Medvedev S.P., Shevchenko A.I., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. № 2(5). P. 18–27.
31. Cohen D.E., Melton D. // *Nat. Rev. Genet*. 2011. V. 12. № 4. P. 243–252.
32. Grskovic M., Javaherian A., Strulovici B., Daley G.Q. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. V. 10. № 12. P. 915–929.
33. 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.



УДК 576.52;577.352

# Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков КОЖИ

А. Л. Риппа<sup>1\*</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>1,2</sup>, А. В. Васильев<sup>1</sup>, В. В. Терских<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: rippa86@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.05.2013

**РЕФЕРАТ** Интегрины играют важнейшую роль в регуляции адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. В связи с многообразием выполняемых функций интегрины необходимы для становления и поддержания целостности гистотипической структуры тканей. Накопилось немало данных, свидетельствующих об участии интегринов в морфогенезе эпидермиса кожи и ее придатков. Создание мышей с тканеспецифическим нокаутом генов интегринов и определение генетической основы ряда кожных заболеваний у человека позволили понять значение интегринов в биологии, физиологии и морфогенезе эпидермиса и волосяного фолликула. Обсуждаются данные о роли различных классов интегриновых рецепторов в биологии эпидермальных клеток, развитии эпидермиса и волосяных фолликулов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** базальная мембрана, волосяной фолликул, дифференцировка, интегрины, кератиноциты, миграция, морфогенез, пролиферация, стволовые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БМ – базальная мембрана; ВКМ – внеклеточный матрикс; ВФ – волосяной фолликул; СК – стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ILK (integrin-linked kinase) – интегрин-связанная киназа.

## ВВЕДЕНИЕ

Интегрины – важнейший класс поверхностных рецепторов, которые связываются с молекулами внеклеточного матрикса (ВКМ) и участвуют таким образом во взаимодействии клеток с окружающей средой, преобразуя сигналы микроокружения во внутриклеточные сигналы и запуская множество регуляторных каскадов. В конечном итоге это может приводить к самым разным вариантам клеточного ответа. Сигналы, поступающие от интегриновых рецепторов, регулируют адгезию, миграцию, рост, дифференцировку и гибель клеток. Нарушение функционирования системы интегринов у многоклеточных животных приводит к развитию различных патологий.

Интегрины – это нековалентно связанные гетеродимерные трансмембранные рецепторы, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, которые образуют функциональный рецептор. В настоящее время известно 18  $\alpha$ - и 8  $\beta$ -субъединиц интегринов позвоночных. Эти 26 субъединиц при взаимодействии образуют по меньшей мере 24 комбинации  $\alpha\beta$ -рецепторов (рис. 1). В зависимости от типа  $\beta$ -субъединиц интегрины подразделяются на три класса. Интегрины  $\beta 1$ , образующие наиболее распространенную группу, связываются

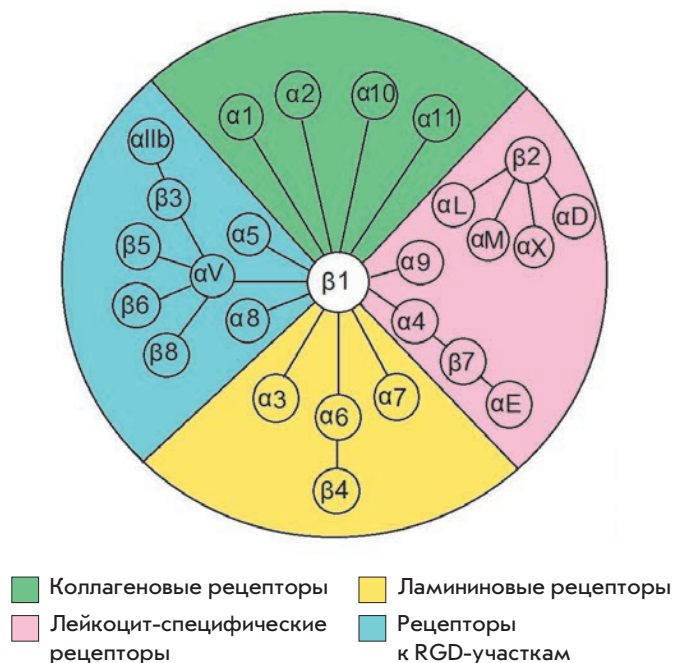
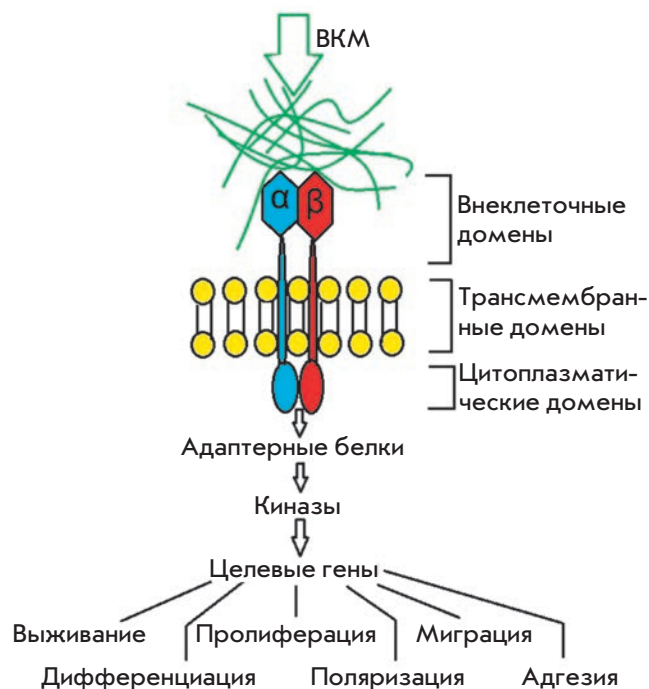


Рис. 1. Схематическое представление семейства гетеродимерных интегриновых рецепторов [1, 2]

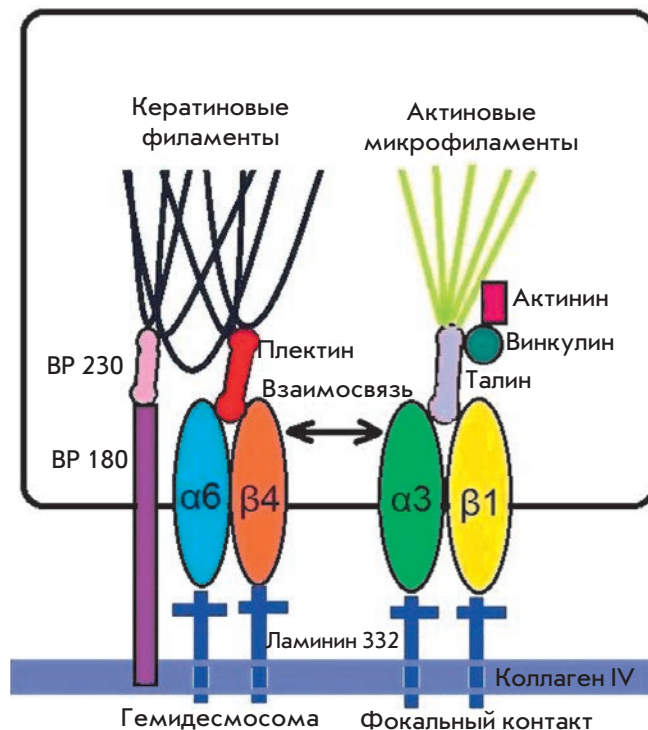


**Рис. 2.** Принцип действия сигналов внеклеточной среды на внутриклеточные процессы через интегриновые рецепторы

главным образом с белками ВКМ. Интегрины  $\beta 2$  экспрессируются только в лейкоцитах, часть из них связывается с поверхностными белками других клеток. Некоторые интегрины  $\beta 3$  экспрессируются в тромбоцитах и мегакариocyтах и играют важнейшую роль в процессах адгезии тромбоцитов и свертывания крови. Остальные  $\beta 3$ -интегрины экспрессируются в эндотелиальных клетках, фибробластах и клетках некоторых опухолей. Рецепторы, включающие субъединицы  $\beta 4$ – $\beta 8$ , немногочисленны и обладают крайне разнообразной структурой, поэтому они не относятся ни к одному из перечисленных классов [1, 2].

Активация интегринa на плазматической мембране со стороны цитоплазмы координирует сборку полимеров цитоскелета, сигнальных комплексов и может индуцировать экспрессию определенных генов. С внеклеточной стороны интегринa контактируют или с макромолекулами ВКМ и базальной мембраны (БМ), или с соответствующими рецепторами соседних клеток, создавая, таким образом, микроокружение клетки. Это взаимодействие управляет внутриклеточными процессами и во многом определяет структуру ткани (рис. 2) [3, 4].

Интегрины обеспечивают адгезию эпителиальных клеток к ВКМ, образуя гемидесмосомы и фокальные контакты.



**Рис. 3.** Интегриновые рецепторы во взаимодействии матрикс–клетка

Гемидесмосомы – структуры, имеющие форму «бляшек», или «кнопок», располагаются с внутренней стороны плазматической мембраны эпителиальных клеток. Они образованы молекулами интегринa  $\alpha 6\beta 4$ , который посредством линкерных белков плакинов прикрепляется к кератиновым филаментам и прочно закрепляет эпидермис на базальной мембране, связываясь с ее компонентами (главным образом с ламинином 332) (рис. 3).

Фокальные контакты представляют собой более сложные структуры, которые образуются в результате группировки интегринов и через адаптерные белки (талин, винкулин,  $\alpha$ -актинин) связываются с актиновым цитоскелетом. Состав и морфология контактов весьма динамичны. Они могут содержать до сотни различных белков, выполняющих адаптерные, сигнальные и другие функции. Фокальные контакты играют роль своеобразных «узлов связи», регулируя поток сигнальных белков и управляя биохимическими сигналами и клеточными реакциями на внешние стимулы (рис. 3).

Интегриновые рецепторы несомненно играют ключевую роль в становлении и поддержании целостности гистотипической структуры тканей. Накопилось немало данных, свидетельствующих о роли интегринов в морфогенезе эпидермиса кожи и ее придатков,

прежде всего волосяного фолликула (ВФ). Наличие волосяного покрова является одной из характерных черт представителей класса млекопитающих. Волосяной покров выполняет различные функции, включая терморегуляционную, защитную, сенсорную и социальную. ВФ развивается и функционирует при тесном взаимодействии клеток эпидермиса и дермы. Эпидермальный компонент ВФ составляют матрикс волоса, наружное корневое влагалище, внутреннее корневое влагалище и стержень волоса. В состав дермального компонента входят дермальная папилла и соединительно-тканый чехлик. Самая внешняя оболочка ВФ – наружное корневое влагалище – переходит снаружи в базальный слой эпидермиса, а изнутри прилегает к внутреннему корневому влагалищу, которое, в свою очередь, окружает стержень волоса. Наружное корневое влагалище имеет утолщение, называемое зоной bulge (англ. bulge – утолщение в верхней трети ВФ), в котором локализуются стволовые клетки (СК). Основание ВФ, или луковица, состоит из специализированных кератиноцитов матрикса волоса и мезенхимных клеток дермальной папиллы. Стержень волоса состоит из терминально дифференцированных кератиноци-

тов (трихоцитов), он представляет собой производное ВФ. С ВФ ассоциированы также сальные железы, кровеносные сосуды, нервные окончания и мышца, поднимающая волос, которая прикрепляется к bulge (рис. 4). В постнатальный период жизни верхняя часть ВФ (включая bulge и сальную железу) и дермальная папилла сохраняются, а остальная часть ВФ подвергается циклическим изменениям, которые подразделяются на стадии роста (анаген), регрессии (катаген) и покоя (телоген). У мышей стадия анагена начинается с закладки ВФ на 14.5 сут эмбрионального развития и продолжается в течение 2 недель после рождения. Затем наступает стадия катагена, длина которой составляет 1 неделю, после чего ВФ вступает в стадию телогена, имеющую такую же продолжительность [5].

Продолжительность анагена ВФ скальпа человека варьирует от 2 до 7 лет, фаза телогена длится около 3 мес., после чего стержень волоса сбрасывается. Каждый ВФ на протяжении жизни в среднем продуцирует 20–30 стержней волос. В норме 95% ВФ скальпа пребывают в фазе анагена и 5% в фазе телогена [6].

В данном обзоре обсуждается роль интегринов, играющих ключевую роль в биологии кожи, а также интегрин-связанной киназы (ILK) как посредника передачи внутриклеточной сигнализации интегринов, функция которой до конца не известна.

### ИНТЕГРИНЫ ЭПИДЕРМИСА

В эпидермисе наиболее распространены интегрины  $\alpha 3 \beta 1$  (преимущественно рецептор ламинина 332),  $\alpha 6 \beta 4$  (компонент гемидесмосом, рецептор ламинина 332) и  $\alpha 2 \beta 1$  (рецептор коллагена и ламинина) [7]. Интегрин  $\alpha \nu \beta 5$  (рецептор витронектина) также является основным эпидермальным интегрином, но он экспрессируется слабее, чем другие интегрины [8]. Кроме того, базальные кератиноциты эпидермиса экспрессируют интегрины  $\alpha 5 \beta 1$  (рецептор фибронектина) и  $\alpha 9 \beta 1$  (рецептор тенасцина С) [9, 10]. Группа  $\beta 1$ -интегринов приурочена, в основном, к базальной поверхности кератиноцитов [7, 8, 11] и участвует в формировании фокальных контактов. Интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  обнаруживается как на базальной, так и на латеральной поверхности базальных кератиноцитов, где он может участвовать в межклеточных контактах [12]. В норме в эпидермисе экспрессия интегринов ограничена базальным слоем и наружным корневым влагалищем ВФ, за исключением интегрин  $\alpha \nu \beta 8$ , обнаруженного в супрабазальных слоях кожи век у мышей [13]. При заживлении ран и при таких патологических состояниях, как псориаз и опухолевая трансформация, интегрины экспрессируются супрабазальными кератиноцитами [14]. Эктопическая экспрессия интегринов  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  и  $\beta 1$  в супрабазальных

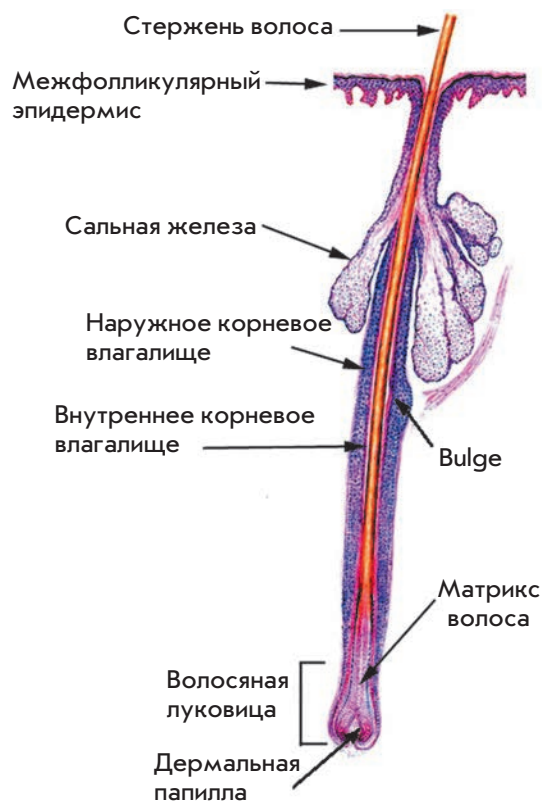


Рис. 4. Строение волосяного фолликула [36]



слоях кожи трансгенных мышей приводит к гиперпролиферации, нарушению дифференцировки и псориазоподобному фенотипу [15].

Создание мышей с тканеспецифическим нокаутом генов интегринов и определение генетических основ ряда кожных заболеваний у человека позволили понять роль интегринов в физиологии и морфогенезе эпидермиса. Предполагается, что интегрины участвуют не только в закреплении кератиноцитов на базальной мембране, но и в регуляции миграции, пролиферации и дифференцировки эпидермальных клеток [6, 14, 16, 17].

### ИНТЕГРИН $\alpha 6 \beta 4$

В первых экспериментах по выяснению роли интегринов в адгезии, миграции и инициации терминальной дифференцировки кератиноцитов использовали интегрин-специфичные антитела, нарушающие адгезию культивируемых кератиноцитов человека к различным компонентам ВКМ [6, 16]. Получение мышей с нокаутом генов индивидуальных интегринов или их субъединиц позволило установить их роль в адгезии кератиноцитов к БМ. Например, мыши с делецией субъединицы  $\alpha 6$  или  $\beta 4$  умирают вскоре после рождения, у них возникают многочисленные волдыри на коже (блистеринг) и стратифицированном плоском эпителии, обусловленные отсутствием гемидесмосом [18–20]. У человека мутации в генах субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$  приводят к развитию буллезного эпидермолиза с атрезией желудка – аутосомного заболевания, при котором на коже возникают пузыри и наблюдается поражение желудочно-кишечного тракта, требующее оперативного вмешательства сразу после рождения [21].

Интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с ламинином 332 в составе ВКМ и с кератиновыми филаментами внутри клетки. Это позволяет координировать клеточный ответ в зависимости от состояния молекул ламинина, а следовательно, регулировать адгезию, миграцию и пролиферацию кератиноцитов. Возможно, это осуществляется через NF- $\kappa$ B или MAPK-зависимый путь, иницируемый активацией  $\beta 4$ -интегрина, а также через активацию малой GTP-азы Rac1. Кроме того, интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  необходим для поддержания целостности гемидесмосом. Показано, что фосфорилирование Ser1424 в эндодомене интегрин  $\beta 4$  приводит к дезинтеграции гемидесмосом на заднем крае мигрирующей клетки [22]. Интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с коллагеном типа XVII и плектином. С помощью этой связи, а также посредством сворачивания своего цитоплазматического домена интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  может вовлекаться в сборку гемидесмосом [12]. Недавно было показано, что инактивация экспрессии субъединицы  $\alpha 6$  вызывает значительное снижение

экспрессии субъединиц  $\alpha 3$  и  $\alpha 2$  на поверхности кератиноцитов человека. Интересно, что такие клетки теряют способность к быстрой направленной миграции по ламинину и коллагену типа I. Предполагается, что интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  может быть центральным регулятором экспрессии других основных интегринов эпидермиса [23]. В то же время в кератиноцитах, полученных от больных с мутацией в гене  $\beta 4$ , экспрессия субъединиц  $\alpha 3$  и  $\alpha 6$  остается на нормальном уровне [24].

Данные о роли интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  в миграции клеток противоречивы. Возможно, это связано с частичной взаимозаменяемостью двух рецепторов интегринов  $\alpha 3 \beta 1$  и  $\alpha 6 \beta 4$ , которые связываются с ламинином 332. Согласно устоявшимся представлениям интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ , связываясь с ламинином 332, обеспечивает точную адгезию, подвижность и сборку ламинина, а интегрин  $\alpha 6 \beta 4$ , связываясь с ламинином 332, способствует стабильной адгезии клеток путем сборки гемидесмосом (рис. 3).

Однако, согласно некоторым данным, гаптотактическая миграция по ламинину 332 опосредуется совместным действием обоих интегриновых рецепторов, причем интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  оказывает трансдоминирующий ингибиторный эффект на  $\alpha 3 \beta 1$ , т.е. при связывании рецептора  $\alpha 6 \beta 4$  функция  $\alpha 3 \beta 1$  может супрессироваться. Однако применение антител к  $\alpha 6 \beta 4$  не влияло на хемотаксис [25]. В дальнейшем предположили, что ингибирование связи  $\alpha 6 \beta 4$  с лигандом ведет к активации дополнительного хемотаксического пути, который зависит от интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ , но при этом клетки мигрируют по отдельности [26]. Клетки без интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  не реагируют на добавление фактора роста эпидермиса (EGF) либо из-за отсутствия взаимодействия рецептора EGF (EGFR) с  $\beta 4$ , либо вследствие супрессии активности интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ . При экспрессии и связывании интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  наблюдалась устойчивая активация Rac1 при воздействии EGF, что приводило к супрессии и перераспределению интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  из базальных фокальных контактов в область межклеточных соединений. Это способствовало миграции кератиноцитов в виде единого пласта. Предполагается, что интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  координирует хемотаксис при заживлении ран. В местах ранения изменяется кинетика связывания интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  с белками ВКМ или интенсивность синтеза его компонентов. При движении клеток интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с секретлируемым ламинином 332. Это усиливает активность Rac1 и приводит к супрессии хемотаксиса, зависящего от  $\alpha 3 \beta 1$ , что, возможно, необходимо для поддержания связи между лидирующими клетками и пластом эпителиальных клеток в целом [26].

## ИНТЕГРИНЫ $\beta 1$

Помимо интегрин  $\alpha 6\beta 4$ , связь с базальной мембраной в коже обеспечивают интегрины, в состав которых входит субъединица  $\beta 1$ .

В отличие от нокаута генов субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$ , полный нокаут генов интегринов  $\beta 1$  приводит к ранней внутриутробной гибели, что делает невозможным определение его роли в коже [27, 28].

В попытке оценить роль интегринов  $\beta 1$  в биологии эпидермиса были получены кератиноциты из  $\beta 1$ -null-ЭСК мыши. Линия  $\beta 1$ -null-ЭСК получена с помощью трансфекции вектора, инактивирующего ген интегрин  $\beta 1$  [29].  $\beta 1$ -null-ЭСК *in vitro* экспрессировали простые кератины, но при индукции не способны были дифференцироваться в кератиноциты и экспрессировать специфичные для эпидермиса кератины 14 и 10, а также инволюкрин.

Интересно, что в тератомах, формирующихся после подкожной трансплантации  $\beta 1$ -null-ЭСК сингенным мышам, наблюдали экспрессию интегрин  $\alpha 6\beta 4$ , кератинов 14 и 1 и инволюкрин, что свидетельствовало о дифференцировке клеток в кератиноциты.

$\beta 1$ -null-кератиноциты обнаруживались также в эпидермисе химерных мышей (дикий тип/ $\beta 1$ -null), у которых формировалась нормальная кожа. Сборка белков ВКМ была значительно нарушена (волокон белков БМ было меньше, они были тоньше и короче) в культурах  $\beta 1$ -null-ЭСК, но оставалась нормальной в тератомах и коже химерных мышей [30]. Поскольку в образование БМ вносят вклад и кератиноциты, и дермальные фибробласты [31], предположили, что неспособность  $\beta 1$ -null-ЭСК *in vitro* дифференцироваться в кератиноциты может быть не столько следствием отсутствия субъединиц  $\beta 1$ , сколько неспособностью к сборке белков БМ. Наблюдаемая *in vivo* дифференцировка в кератиноциты могла происходить за счет сборки БМ клетками дикого типа из окружающей ткани [30].

Однако впоследствии экспериментально показали, что существует по крайней мере еще одно возможное объяснение наблюдаемых явлений. Так, ни контакт с БМ, ни присутствие нормальных эпидермальных кератиноцитов не восстанавливают способность  $\beta 1$ -null-ЭСК дифференцироваться в кератиноциты [32]. В исследовании, выполненном с применением деэпителизированной «мертвой» дермы с сохранившейся БМ,  $\beta 1$ -null-ЭСК не обладали способностью дифференцироваться в кератиноциты. Сокультивирование с нормальными эпидермальными кератиноцитами также было неэффективным. Однако заселение дермы нормальными дермальными фибробластами приводило к образованию большого количества эпидермальных цист из ЭСК дикого типа и небольших групп клеток, положительных по кератину 14, дифферен-

цированных из  $\beta 1$ -null-ЭСК. Кондиционированная фибробластами среда стимулировала дифференцировку кератин 14-положительных клеток в эмбрионидных тельцах дикого типа и  $\beta 1$ -null. Показано, что фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста фибробластов 10 (FGF10), выделяемые фибробластами, и трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) стимулируют дифференцировку ЭСК в эпидермальном направлении. При этом эффект факторов роста был более выраженным в культуре клеток с нокаутом  $\beta 1$  [32]. По-видимому, это можно объяснить тем, что концентрации факторов роста в ростовой среде не были лимитирующими для ЭСК дикого типа. Отсутствие интегринов  $\beta 1$  снижает, предположительно, чувствительность ЭСК к растворимым факторам, индуцирующим дифференцировку кератиноцитов. Поэтому для стимуляции дифференцировки  $\beta 1$ -null-ЭСК необходимы высокие концентрации индукторов. Эти результаты подтверждают известный синергизм между интегринными и факторами роста и указывают на его присутствие на самых ранних этапах развития, в том числе в ходе развития кожи. Следует также указать, что ЭСК мышей с нокаутом гена интегрин  $\beta 1$  не могли расти в присутствии фидерных клеток, тогда как для ЭСК дикого типа необходим фидер из непролиферирующих фибробластов. В связи с этим возникает вопрос о роли фидерных клеток в обеспечении способности ЭСК дифференцироваться в кератиноциты.

Разработка технологии получения мышей с тканеспецифическим нокаутом генов позволила избежать трудностей с изучением мутаций, приводящих к внутриутробной гибели эмбрионов. Чтобы изучить последствия эпидермис-специфичной делеции интегринов  $\beta 1$ , мышей с фланкированными LoxP-сайтами аллелями гена субъединицы  $\beta 1$  скрещивали с мышами, экспрессирующими Cre-рекомбиназу под контролем промоторов генов кератин 14 или 5, которые активируются в базальном слое эмбрионального эпидермиса [33, 34]. У потомства этих мышей наблюдали эпидермальный блистеринг, но менее выраженный, чем при нокауте субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$ .

В тонкой и хрупкой коже мышей с эпидермис-специфическим нокаутом субъединиц  $\beta 1$  (Cre-рекомбиназа под контролем промотора кератин 14) отмечено почти полное отсутствие БМ, нестабильность гемидесмосом, резкое снижение пролиферативного потенциала эпидермиса, неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Мышата обычно умирали через несколько часов после рождения, вероятно, из-за отсутствия эпидермального барьера и дегидратации. Тем не менее программа терминальной дифференцировки кератиноцитов у животных не изменялась [33], что противоречило выводам, сделанным

в работах с использованием трансфекции мутантных субъединиц  $\beta 1$  в культуре и исследований суспензионных культур кератиноцитов [35, 37]. Полученные результаты указывают на решающую роль интегринов, содержащих субъединицу  $\beta 1$ , в поддержании пролиферативного потенциала развивающегося эпидермиса [33]. Интересной представляется неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса инвагинации растущего ВФ и ремоделирования им ВКМ, изучены недостаточно. Очевидно, что не последнюю роль в нем играют интегрины, в частности, содержащие субъединицу  $\beta 1$ .

Получены мыши с нокаутом генов субъединиц  $\beta 1$  в коже эмбрионов (ген Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 5). Эти мыши оставались жизнеспособными в течение 4–6 недель [34], и к этому времени полностью утрачивали ВФ. У мутантных мышей развивались аномалии ВФ и прогрессирующая потеря волос из-за снижения пролиферации клеток матрикса волоса. В итоге деформированные ВФ замещались инфильтратом макрофагов, эпидермис кожи спины утолщался, базальный слой эпидермиса был дезорганизованным, клетки имели аномальную морфологию, наблюдались нарушения в формировании БМ, снижалось количество гемидесмосом, развивался блистеринг. В отличие от предыдущего исследования, наблюдалось увеличение числа слоев дифференцированных кератиноцитов в эпидермисе. Целостность БМ, окружающей ВФ, не нарушалась, возможно, из-за меньшего механического напряжения, чем в межфолликулярном эпидермисе или меньшей зависимости структуры БМ вокруг ВФ от интегринов  $\beta 1$ . В конечном итоге развивался дермальный фиброз [34]. Наблюдалось также снижение пролиферативного потенциала кератиноцитов, но, как справедливо замечают, это может быть вызвано не непосредственным отсутствием субъединицы  $\beta 1$ , а, например, сопутствующим снижением экспрессии интегрин  $\alpha 6\beta 4$ .

Полученные в обоих исследованиях результаты изучения последствий делеции интегринов  $\beta 1$  в эмбриональном эпидермисе указывают на важную роль интегринов  $\beta 1$  в формировании ВФ, организации БМ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов. Известно, что при удалении интегринов  $\beta 1$  ВФ дегенерируют и не способны к циклическим изменениям, поэтому предполагается, что интегрины  $\beta 1$  участвуют в поддержании компартмента СК или активации СК при инициации стадии анагена [34]. Однако результаты эпидермис-специфического нокаута генов интегринов  $\beta 1$  различались в зависимости от того, какой тканеспецифический ген (K5 или K14) использовали для активации Cre-рекомбиназы.

Некоторые мыши с тканеспецифическим нокаутом интегринов  $\beta 1$  в эпидермисе жили достаточно долго. Это позволяло провести эксперименты по заживлению ран, которые подтвердили, что  $\beta 1$  необходим для миграции кератиноцитов [38].

Индукцируемая в эмбриогенезе эпидермис-специфическая делеция гена интегрин  $\beta 1$  [33, 34] не позволяла полностью оценить ее влияние на программы пролиферации, дифференцировки, развития и поддержания ВФ из-за развивающегося фиброза, воспалительного процесса или смерти животных. Чтобы отличить первичные последствия нокаута субъединицы  $\beta 1$  от вторичных, сравнили последствия нокаута гена интегрин  $\beta 1$  в эпидермисе на 14.5 сут эмбриогенеза мыши (с помощью Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 5 – K5Cre $\beta 1$ null) и индуцированной делеции во взрослом эпидермисе (с помощью 4-гидрокситамоксифена и CreER-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 14 – K14CreER) [39]. В первом случае (K5Cre $\beta 1$ null) наблюдали увеличение количества слоев дифференцированных клеток, дегенерацию ВФ, сальных желез, снижение пролиферации, отделение эпидермиса от подлежащей дермы. У этих животных обнаружили аномальное накопление коллагена типа IV и ламинина 332 в дерме. Удаление субъединицы  $\beta 1$  интегрин в эмбриональном эпидермисе (K5Cre $\beta 1$ null) вызывало нарушение терминальной дифференцировки, приводило к увеличению слоев клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для дифференцированных кератиноцитов (кератин 10, корнифин, лорикрин и трансклутаминаза 1). Это противоречит данным, которые свидетельствуют в пользу сохранения программы дифференцировки эпидермальных клеток у мышей с тканеспецифическим нокаутом интегрин  $\beta 1$  [33]. Сохранившиеся ВФ все еще экспрессировали маркеры СК на высоком уровне. Во втором случае нокаут  $\beta 1$  в эпидермисе взрослых животных (K14CreER) привел к незначительным изменениям в эпидермисе. Основной аномалией было увеличение количества меланоцитов. Также наблюдалось нарушение дифференцировки межфолликулярного эпидермиса, уменьшение размеров сальных желез. ВФ сохранялись, но наружные корневые влагалища ВФ были увеличены, луковицы некоторых ВФ были тонкими и продолговатыми, в некоторых областях межфолликулярного эпидермиса обнаружено значительное количество пролиферирующих клеток. На 30-й день после обработки гидрокситамоксифеном сохранялась высокая экспрессия маркеров СК в зоне bulge.

Фенотипические изменения, наблюдаемые при удалении интегринов  $\beta 1$  в зрелом эпидермисе, были гораздо менее выраженными, чем при делеции



во время внутриутробного развития. В обоих случаях отсутствовали очевидные изменения в компартменте СК ВФ [39].

Поскольку описанные модели животных с различными дефектами экспрессии субъединиц  $\beta 1$  не учитывали вклад конкретных  $\alpha$ -субъединиц интегринов в регуляцию, изучили, как влияет отсутствие интегрин  $\alpha 3\beta 1$  на зрелую кожу и развитие ВФ [40].

Интегрин  $\alpha 3\beta 1$  обильно экспрессируется в коже, *in vivo* он локализован между гемидесмосомами и связывает БМ с актиновым цитоскелетом. Инактивация  $\alpha 3$ -субъединицы интегрин приводит к смерти мышат вскоре после рождения, у животных наблюдались дефекты развития почек и легких [41]. У новорожденных  $\alpha 3$ null-мышей на подушечках стоп появлялись пузыри, при этом структура гемидесмосом оставалась нормальной. Анализ экспрессии ламинина 332 выявил области дезорганизации зоны БМ. Программа дифференцировки и стратификации эпидермиса не изменялась [42]. Позднее установили, что ни интегрин  $\alpha 3\beta 1$ , ни  $\alpha 6\beta 4$  не существенны для морфогенеза и гомеостаза эпидермиса в ходе развития кожи, если эпидермис остается прикрепленным к дерме. Мышиные эмбрионы, у которых отсутствовали данные интегрины, имели нормальную программу пролиферации и частоту апоптоза в местах сохранения целостности БМ до момента образования пузырей [43]. Важным был контакт между эпидермисом и дермой, который непродолжительное время обеспечивался неизвестным компенсаторным механизмом. По мере развития блистеринга в ходе эмбриогенеза интенсивность апоптоза возрастала. К сожалению, морфогенез ВФ при удалении интегринов  $\alpha 3\beta 1$  или  $\alpha 6\beta 4$  не обсуждается [43].

Для дальнейшего изучения последствий удаления интегрин  $\alpha 3\beta 1$  кожу новорожденных животных с нокаутом этого интегрин пересадили бестимусным мышам. В зрелых трансплантатах наблюдались нарушение организации БМ в межфолликулярном эпидермисе и возникновение серьезных аномалий морфологии ВФ после первого цикла развития: задержка роста ВФ, дезорганизация F-актина в ВФ, фрагментация ВФ, отклонения в накоплении пигмента и образование кластеров ВФ. Пристальное изучение этих трансплантатов позволило сделать вывод о том, что интегрин  $\alpha 3\beta 1$  не является обязательным для дифференцировки зрелого межфолликулярного эпидермиса, но необходим для регуляции различных процессов морфогенеза и поддержания ВФ. При деляции интегрин  $\alpha 3\beta 1$  зрелая кожа может полностью развиваться и формировать ВФ и сальные железы, поэтому, по всей видимости, интегрин  $\alpha 3\beta 1$  не является необходимым для поддержания эпидермальных СК. Однако после первого цикла в ВФ возникают

значительные нарушения, снижается пролиферация и апоптоз, что свидетельствует о продолжительном пребывании ВФ в фазе покоя, а образующиеся кластеры могут отражать безуспешные попытки ВФ вступить в следующую фазу роста. Эти данные показывают, что интегрин  $\alpha 3\beta 1$  играет важную роль в специфической регуляции морфологии ВФ в течение фазы катагена цикла ВФ [40].

Учитывая данные о роли интегринов  $\beta 1$  в формировании и поддержании ВФ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов, структуризации БМ, а также о возможном участии в поддержании или активации популяции СК, можно предполагать, что у мышей в результате активации интегриновых рецепторов  $\beta 1$ , как минимум, меняется экспрессия ключевых генов, вовлеченных в развитие и формирование ВФ. Фенотипические проявления, наблюдаемые при инактивации этих генов, сходны с фенотипом, обусловленным нокаутом генов интегринов  $\beta 1$ .

Обнаружено, что некоторые факторы транскрипции, такие, как *hairless*, комплекс  $\beta$ -катенин-LEF-1-TCF-1 или *Sonic hedgehog*, вовлечены в пролиферацию кератиноцитов матрикса волоса и зачатков ВФ [44, 45]. Фенотип мутаций, ведущих к инактивации этих белков, частично перекрывается с фенотипом  $\beta 1$ -null-ВФ. У мышей с мутацией *hairless* приблизительно на 15-й день после рождения происходит преждевременный апоптоз кератиноцитов матрикса волосяной луковицы наряду с увеличением скорости пролиферации, наблюдается неправильное расположение внутреннего корневого влагалища и атрофия наружного корневого влагалища. Наружное корневое влагалище и волосяная луковица распадаются на отдельные кластеры клеток [44]. У мышей с инактивацией гена *LEF-1* отсутствуют вибриссы и ВФ, как и у мышей с эпидермис-специфичным нокаутом гена интегрин  $\beta 1$  [46]. Трансплантаты кожи мышей *Shh*-/-, пересаженные животным с иммунодефицитом, не могут правильно дифференцироваться и формируют гиперпролиферативные фолликулоподобные структуры, которые не способны продуцировать зрелые стержни волос [47, 48]. Интересно понять, могут ли кератиноцит-специфичные мутации, приводящие к усиленной активности этих белков, восстанавливать фенотип  $\beta 1$ -null-ВФ, по крайней мере частично.

#### ИНТЕГРИН-СВЯЗАННАЯ КИНАЗА

Связывание с лигандом индуцирует кластеризацию интегринов, в результате которой формируются комплексы, состоящие из множества молекул. Аффинность интегринов и лигандов регулируется внутриклеточными сигналами, что приводит к активации интегринов. Ключевыми регуляторами активации являются талины и киндлины, которые свя-

зывают цитоплазматические домены интегринов  $\beta 1$  и  $\beta 2$  [49]. Внутриклеточный путь передачи сигнала от интегринов после их связывания с белками ВКМ остается изученным не до конца. Интегрины не обладают ферментативной активностью, у них отсутствуют сайты связывания с актином. Предполагается, что сигналы передаются через множество киназ и белков-посредников.

Наиболее вероятно, что связывание интегринов с актиновым цитоскелетом опосредуется талином,  $\alpha$ -актинином и винкулином. Талин необходим для передачи усилия на субстрат, формирования адгезионных контактов, связывания интегринов с цитоскелетом и последующего распластывания клеток [50]. Талин может связывать интегрины с актином разными способами: прямо и через винкулин, который, в свою очередь, связывается с  $\alpha$ -актинином и актином. Удаление  $\alpha$ -актина также ингибирует формирование адгезионных контактов, но его роль в передаче силы на субстрат не изучена [51]. Нокаут гена винкулина, в отличие от генов талина и  $\alpha$ -актина, не имеет драматических последствий. По-видимому, винкулин важен для прочности контактов, но не критичен для их формирования [52].

Контакты, опосредованные интегринными, очень сложные структуры, в которых могут участвовать более 150 различных молекул [53, 54]. В состав этих комплексов входят интегральные мембранные белки (интегрины, синдеканы); белки, связывающиеся с актином (талины, винкулин,  $\alpha$ -актинин); сигнальные и адаптерные белки (тирозинкиназа Src, киназа фокальной адгезии FAK, паксиллин и ILK) [55–60]. Фокальные контакты также содержат активную p21-киназу (PAK), GTP-азы семейства Rho, регулирующие полимеризацию актина, сокращение миозина 2, динамику и организацию микротрубочек [61], кальций-зависимую протеазу кальпаин 2 [62] и тирозинфосфатазу SHP-2 [63], которые, вероятно, временно связываются с адаптерными белками и регулируют миграцию.

Протеинкиназа ILK, еще один компонент фокальных контактов [59], первоначально была определена как белок, связывающий интегрины  $\beta 1$  [64]. ILK необходима для выживания, миграции и адгезии клеток. Опосредуя взаимодействие с разнообразными белками, включая интегрины  $\beta 1$  и  $\beta 3$ , PINCH, паксиллин и парвин, она служит посредником между интегринными и актиновым цитоскелетом [59, 65].

Киназная активность ILK и фосфорилирование некоторых белков, включая протеинкиназу B (PKB/Akt) и киназу  $\beta 3$  гликогенсинтазы (GSK  $\beta 3$ ), описаны в некоторых работах [71, 73].

GSK  $\beta 3$  обнаружена в зоне bulge органов культивированных зрелых ВФ человека, где она солокализовалась

с маркерами bulge – цитокератинами 15, 19 и CD200. Ингибирование активности гликогенсинтазы в этой области способствовало увеличению пролиферации клеток наружного корневого влагаллица, что предполагает возможное участие GSK  $\beta 3$  в поддержании компартмента СК ВФ [66]. Развитие и циклические изменения в постнатальном организме ВФ существенно зависят от инактивации GSK  $\beta 3$  [67, 68]. Активная нефосфорилированная GSK  $\beta 3$  может фосфорилировать и связывать  $\beta$ -катенин с белком APC, что приводит к деградации  $\beta$ -катенина. Фосфорилирование GSK  $\beta 3$  инактивирует киназу и приводит к стабилизации и транслокации  $\beta$ -катенина в ядро, где он взаимодействует с ДНК-связывающими белками семейства Lef1/Tcf, которые активируют транскрипцию таких генов-мишеней, как гены циклина D, гомеобоксодержащих факторов транскрипции, *c-myc*, *Lef1* и кератинов волос [69, 70]. ILK, фосфорилируя GSK  $\beta 3$  [71, 72] или ингибируя комплекс деградации  $\beta$ -катенина [73], может модулировать стабильность  $\beta$ -катенина и, следовательно, играть важную роль в морфогенезе ВФ.

Тем не менее функции ILK окончательно не установлены, так как результаты, полученные как *in vitro*, так и *in vivo*, указывают скорее на адапторную, чем на киназную активность ILK [74–80]. Предполагается, что ILK содержит псевдокиназный сайт, неспособный к фосфорилированию [81]. Так, степень фосфорилирования GSK  $\beta 3$  и PKB/Akt в фибробластах, в которых отсутствовала ILK, была такой же, как в контроле. По-видимому, ILK не участвует в фосфорилировании этих киназ [74].

В пользу этой гипотезы свидетельствуют и другие данные, согласно которым ILK не регулирует фосфорилирование GSK  $\beta 3$ , стабильность и активность  $\beta$ -катенина в ВФ, дифференцировку клеток матрикса во внутреннее корневое влагаллице и стержень волоса. Кератиноцит-специфический нокаут гена *ILK* (K5-Cre) у мышей (ген Cre-рекомбиназы под промотором гена кератина 5) приводил к нарушению адгезии кератиноцитов, целостности БМ, блистерингу, эктопической пролиферации кератиноцитов в супрабазальных слоях, аномальной дифференцировке кератиноцитов, гиперплазии эпидермиса, дефектам в формировании ВФ и алопеции. Нарушение формирования ВФ связано со скоплением пролиферирующих клеток в наружном корневом влагаллице; дифференцировка клеток матрикса ВФ и поддержание СК при этом не изменялись. Мыши с нокаутом гена *ILK* жили длительное время [80].

В отличие от нокаута генов  $\beta 1$ -интегринов, при котором снижается пролиферация эпидермальных кератиноцитов и клеток матрикса ВФ [33, 34], при нокауте *ILK* (K5-Cre) число пролиферирующих клеток

матрикса ВФ уменьшалось незначительно. Напротив, существенное увеличение числа пролиферирующих клеток зарегистрировано в наружном корневом влагалитце. Поскольку клетки наружного корневого влагалитца происходят из CD34<sup>+</sup>-популяции стволовых клеток bulge [82], проверили, влияет ли отсутствие ILK на эту популяцию клеток. Оказалось, что ВФ содержат CD34<sup>+</sup>-клетки, которые дают начало транзиторным клеткам. Так как пролиферирующие клетки накапливались в наружном корневом влагалитце, а не в матриксе волоса, был сделан вывод, что ILK необходима транзиторным клеткам для миграции в матрикс или образования зачатка волоса во время анагена.

Интересно, что в культуре кератиноцитов отсутствие ILK влияло на формирование фокальных контактов и препятствовало устойчивой направленной миграции. Клетки также проявляли слабую адгезию, опосредованную интегринами, поэтому не могли фиксировать ламеллоподии, что приводило к изменениям миграции [80].

Изучали также последствия удаления ILK, индуцированного экспрессией кДНК Cre-рекомбиназы под промотором гена кератина 14 (K14-Cre). В отличие от тканеспецифического нокаута с использованием K5-Cre [80], в данном варианте инактивации гена *ILK* мыши в среднем доживали до 4-го дня постнатального развития. Следует отметить, что и при нокауте гена интегрин  $\beta 1$ , когда экспрессия Cre-рекомбиназы контролировалась промотором гена кератина 14, животные умирали вскоре после рождения, а при использовании промотора гена кератина 5 доживали до 6 недель [33, 34]. Эти отличия можно объяснить, если учесть, что кератин 14 начинает экспрессироваться на 11.5 сут эмбрионального развития [83], а кератин 5 – примерно на 15-е [80], когда эпидермис уже стратифицирован и начался морфогенез ВФ. Подобные фенотипические отличия могут отражать проявление активности генов кератинов или различий в интенсивности и/или времени экспрессии Cre-трансгена и инактивации гена *ILK* во время эмбриогенеза.

Итак, при удалении ILK с использованием системы K14-Cre морфогенез ВФ был ослаблен. Так как пролиферация ВФ снижалась, сокращалось их число, и морфогенез до конца не завершался. Отсутствие ILK вызывало аномалии в гемидесмосомах и множественный микроблистеринг, дезорганизацию кератиноцитов супрабазальных слоев и актинового цитоскелета, нарушения адгезии, поляризации и миграции.

ILK считается мишенью  $\beta 1$ -интегринов. Отсутствие ILK и  $\beta 1$ -интегринов в коже приводит к возникновению ряда сходных нарушений, включая аномальное формирование и функционирование ВФ,

снижение пролиферативной активности фолликулярных кератиноцитов, развитие блистеринга.

Кератиноциты, в которых отсутствовала ILK, в культуре имели дефекты адгезии и пролиферации. Снижение скорости пролиферации напоминало нарушения, наблюдаемые в ВФ, но не в межфолликулярном эпидермисе. Известно, что нормальная пролиферация первичных кератиноцитов в культуре зависит от активации  $\alpha 3\beta 1$ -интегринов [84]. Учитывая, что первичные культивируемые кератиноциты состоят из транзиторных и коммитированных прогениторных клеток, снижение пролиферации лишенных ILK кератиноцитов может быть следствием нарушения внутриклеточной сигнализации  $\beta 1$ -интегринов в этой популяции клеток. Не исключено также нарушение пролиферации СК, но эту гипотезу предстоит еще проверить.

При инактивации гена *ILK* наблюдали нарушение не только адгезии и пролиферации, но также поляризации и миграции культивируемых кератиноцитов мыши [85]. Ключевым событием поляризации является активация Rac1 в лидирующем крае клетки, вызывающая образование и стабилизацию ламеллоподий с помощью интегрин  $\alpha 3\beta 1$  [86]. Инфицирование аденовирусом, несущим конститутивно активный *Rac1*, приводит к восстановлению дефектов поляризации в кератиноцитах с дефицитом ILK. Таким образом, ILK является важнейшим компонентом сигнального пути, который связывает стимуляцию интегринов с рекрутированием Rac1 к плазматической мембране, с активацией распластывания и направленной миграции кератиноцитов [85]. Стабилизация ламеллоподий также может нарушаться, если нормальные клетки трансфицировать мутантным геном *Rac1*. При этом одного Rac1 недостаточно для стабилизации ламеллоподий, поскольку в кератиноцитах с дефицитом интегрин  $\alpha 3\beta 1$  конститутивная экспрессия *Rac1* не восстанавливала характер миграции [86].

Последствия инактивации ILK в СК ВФ изучали с помощью тканеспецифического нокаута с использованием системы K15-Cre, специфичной для СК ВФ [87].

При индуцируемой инактивации ILK в СК ВФ волосяные фолликулы были способны вступать в анаген. Стволовые клетки bulge, в которых отсутствовала ILK, успешно мигрировали из bulge и дифференцировались в клетки наружного корневого влагалитца и матрикса ВФ, вступивших в фазу роста. Следовательно, отсутствие ILK в СК ВФ не влияет на их миграцию, способность производить популяцию транзиторных клеток и обеспечивать регенерацию ВФ. В то же время поведение в культуре кератиноцитов, выделенных из bulge опытных мышей (K15-Cre), отличалось от поведения контрольных. Эффективность



адгезии к покрытому ВКМ пластику была низкой. Эти результаты совпали с данными, полученными на кератиноцитах, выделенных из эпидермиса новорожденных мышей, в которых ILK удалена с помощью K14-Cre [85]. Отсутствие ILK в СК ВФ в основном выражалось в снижении способности клеток bulge дифференцироваться в клетки межфолликулярного эпидермиса при заживлении ран. Закрывание ран на спине опытных животных происходило позже, чем в контроле. Те немногочисленные кератиноциты bulge, которые участвовали в регенерации эпидермиса, обладали невысоким пролиферативным потенциалом. Следовательно, ILK необходима для миграции потомства стволовых клеток bulge в регенерирующий эпидермис и пролиферации клеток в ходе эпителизации раневой поверхности. Учитывая дефекты адгезии и миграции кератиноцитов новорожденных мышей с эпидермис-специфической делецией *ILK* [80, 85], а также данные по инактивации ILK в СК bulge [87], можно предположить, что ILK опосредует взаимодействие клеток с ВКМ и вносит вклад в закрепление кератиноцитов на базальной мембране.

Молекулярные пути, модулируемые ILK, изучены недостаточно. Заполнить пробелы в понимании роли ILK в эпидермисе попытались, определяя экспрессию генов методом микроэррей-анализа [88]. С этой целью сравнили экспрессию генов в нормальном эпидермисе мыши на 3-й день после рождения и в эпидермисе с инактивированным геном *ILK*, применив тканеспецифический нокаут (K14-Cre). Выявлено снижение экспрессии 27% транскриптов, которые кодируют специфичные для волоса кератин и белки, ассоциированные с ними, например кератин 31, кератин-связанный белок 3-3 и другие, что согласуется с нарушениями, наблюдаемыми в ВФ. Также уровни экспрессии десмоглеина 4, важного для структурной целостности десмосом кутикулы и кортекса ВФ, и трихогиалина, компонента внутреннего корневого влагалища, были соответственно в 18 и 28 раз меньше нормы. Значительное снижение экспрессии этих генов согласуется с представлениями о важности экспрессии ILK после стадий 4–5 формирования фолликула.

ILK также играет важную положительную модулирующую роль в дифференцировке кератиноцитов и формировании эпидермального барьера. Этим объясняется наблюдаемое у мышей с инактивацией ILK в эпидермисе снижение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты и факторы, необходимые для сшивки белков и биосинтеза липидов, таких, как транслугаминаза 3, субстрат транслугаминаз Prr9 и др.

В отсутствие ILK в эпидермисе возрастает экспрессия генов, вовлеченных в сигнальные пути Wnt

и Shh, которые при нормальном морфогенезе кожи активны на ранних стадиях развития ВФ, в то время как на поздних стадиях их активность снижается. Остановка развития ВФ на стадиях 2–4 в постнатальном эпидермисе в отсутствие ILK может свидетельствовать о повышении экспрессии генов сигнальных путей Wnt и Shh.

Анализ транскриптома постнатального эпидермиса с нокаутом гена *ILK* выявляет важную роль данной киназы в развитии ВФ, созревании кератиноцитов и формировании барьерной функции, а также в пигментации и регенеративных процессах [88].

### ИНТЕГРИНЫ $\beta 1$ КАК МАРКЕРЫ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Поведение стволовых клеток контролируется взаимодействием между внутренними транскрипционными программами и внешними сигналами [89]. Внешние сигналы обеспечиваются локальным микроокружением или нишей, в которой находятся стволовые клетки. ВКМ является важным компонентом ниши стволовых клеток [90–93].

В области bulge, где располагаются стволовые клетки ВФ, состав внеклеточного матрикса значительно отличается от состава в остальных участках эпидермиса [94, 95]. В этой области в несколько раз повышена экспрессия коллагенов типов VI, XVIII, V, тенасцина С, периостина, богатого цистеином гликопротеина, нефронектина и некоторых других компонентов ВКМ. Функциональное значение этих различий остается малоизученным. Несомненным представляется непосредственное участие ВКМ и интегриновых рецепторов в регуляции судьбы эпидермальных СК. Интересно, что структура ВКМ в центральной части роговицы, содержащей дифференцирующиеся клетки, и в лимбе, содержащем СК роговицы, также существенно различаются. Область лимба обогащена коллагенами VII, XVI и IV, тенасцином С, витронектином и ламинином [96]. Соответственно различается и спектр интегринов, экспрессируемых в этих областях роговицы. Медленно пролиферирующие, сохраняющие метку ДНК, клетки лимба характеризуются повышенной экспрессией интегринов  $\beta 1$  и  $\beta 4$ , а также  $\alpha 6$ . Мелкие клоногенные клетки из корнеосклерального кольца выделены на основании фенотипа  $\alpha 6^{\text{bright}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$  [97], использованного также для выделения популяции эпидермальных СК [98].

В настоящее время показано, что интегрины могут использоваться для обогащения СК популяций, получаемых из различных тканей [99–102].

В культуре кератиноцитов человека популяции СК и транзиторно-амплифицируемых клеток разделили по степени экспрессии  $\beta 1$ -интегринов и скоро-

сти адгезии к белкам ВКМ. Популяция СК с высоким уровнем экспрессии  $\beta 1$ -интегринов обладала высокой колониеобразующей эффективностью и адгезировала к белкам ВКМ намного быстрее транзитного компартмента, клетки которого после одного или пяти циклов деления подвергались терминальной дифференцировке [103]. Подвижность клеток зависит от уровня экспрессии интегринов, причем при высоком уровне подвижность ингибируется, а наиболее благоприятен для подвижности клеток промежуточный уровень [104]. Таким образом, транзитные клетки, слабо экспрессирующие  $\beta 1$ -интегрины, должны быть значительно более подвижными, чем сильно экспрессирующие СК, что подтверждено с помощью цейтраферной съемки. Более того, при высокой плотности культуры транзитные клетки были рассредоточены, в отличие от компактно расположенных СК [11].

Высокий уровень экспрессии интегринов  $\beta 1$  (яркое свечение после окраски антителами) использовали в качестве маркера для определения пространственной организации СК и их потомков в эпидермисе человека [11]. Кератиноциты с низкой экспрессией интегринов этого класса выходили из компартмента СК, начинали интенсивно пролиферировать и подвергались дифференцировке.

В эпидермисе мыши интегрины  $\beta 1$  интенсивно экспрессируются в зоне bulge ВФ и активно используются в качестве маркеров этой зоны [68]. Однако использовать экспрессию  $\beta 1$ -интегринов в качестве маркеров клеток bulge ВФ человека не представляется возможным, поскольку они экспрессируются на всем протяжении внешнего слоя наружного корневого влагалища, соединительно-тканного чехлика и в дермальной папилле [105].

Сходные результаты получены при оценке экспрессии интегринов  $\beta 1$  в органных культурах ВФ кожи головы человека. В сайтах иммунореактивности интегринов  $\beta 1$  наблюдалась также коэкспрессия фибронектина и тенастина С. Исследователи не обнаружили значительного повышения иммунореактивности  $\beta 1$ -интегринов *in situ* в зоне bulge. Применение активирующих интегрины  $\beta 1$  антител и имитирующих натуральные лиганды, трипептидов RGD (арг-гли-асп) *in vitro* способствовало росту органных культур ВФ, выделенных с помощью микродиссекции, и препятствовало их спонтанной регрессии. Таким образом, несмотря на отсутствие повышенной экспрессии интегринов  $\beta 1$  в СК ВФ человека, сигнальные пути с их участием играют, по-видимому, определенную роль в контроле роста фолликулов. Данный подход может стать потенциальным инструментом для предотвращения потери волос у человека путем направленной стимуляции внутриклеточной сигнализации  $\beta 1$ -интегринов [106].

Показано, что интегрины  $\beta 1$  и MAP-киназа способствуют поддержанию компартмента СК *in vitro*. При трансфицировании культуры кератиноцитов человека ретровирусом, содержащим мутантную субъединицу интегрин  $\beta 1$  (доминантно-негативная мутация), снижался поверхностный уровень экспрессии этих субъединиц, адгезивность клеток и активация MAP-киназы. Это приводило к дифференцировке СК [17].

На модели химического канцерогенеза кожи показано, что эпидермис-специфический нокаут гена интегрин  $\alpha 3$  замедляет стадию инициации под действием диметилбензантрацена (DMBA), способствуя выходу СК ВФ из ниши и их дифференцировке, препятствуя таким образом накоплению трансформированных клеток в коже. Дальнейшая обработка форболовым эфиром не приводила к прогрессии опухолевого роста у экспериментальных животных. В то же время при длительном воздействии только DMBA в однокомпонентном протоколе прогрессия опухолей с переходом в злокачественную форму в эпидермисе животных с нокаутом гена интегрин  $\alpha 3$  проходила эффективнее и с большей скоростью, хотя число очагов малигнизации было ниже [107].

Интегрины  $\beta 1$  необходимы для апикальной локализации комплекса белков, регулирующих асимметричное деление эпидермальных СК, которое обеспечивает баланс между расположенными на БМ стволовыми и прогениторными клетками и их дифференцирующимися потомками в супрабазальных слоях эпидермиса [108].

Интегрины могут активировать непосредственно рецепторы факторов роста в отсутствие этих факторов [109].

Интегриновые рецепторы сочетают функции механического прикрепления клеток к субстрату и двунправленной сигнализации. Они, с одной стороны, обеспечивают адекватную реакцию клетки на сигналы среды, а с другой – позволяют клетке самой модулировать свое микроокружение. В эпидермисе адгезия базальных клеток к БМ критична для прочного соединения эпидермиса с дермой, поддержания гистотипической структуры эпидермиса и выполнения им защитных функций. Однако этим функции интегринов не исчерпываются. Помимо участия в сборке белков БМ, интегрины осуществляют контроль ориентации митотического веретена и апикальной локализации белкового комплекса при асимметричном делении базальных кератиноцитов, способствуя непрерывной регенерации эпидермиса и поддержанию пула базальных кератиноцитов. Регулируя миграцию, пролиферацию и дифференцировку эпидермальных клеток, интегрины в конечном счете во многом определяют морфогенез кожи и ее при-

датков. Нарушение экспрессии интегринов приводит к задержке развития ВФ в эмбриогенезе или к деградации фолликулов и потере волос во взрослом со-

стоянии. Нарушения в экспрессии интегринов могут лежать в основе многих патологических состояний, в том числе малигнизации. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hynes R.O. // *Cell*. 2002. V. 110. № 6. P. 673–687.
2. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. // *Cell Tissue Res*. 2010. V. 339. № 1. P. 269–280.
3. Bouvard B., Brakebusch C., Gustafsson E., Aszódi A., Bengtsson T., Berna A., Fässler R. // *Circ. Res*. 2001. V. 89. № 3. P. 211–223.
4. Bokel C., Brown N.H. // *Dev. Cell*. 2002. V. 3. № 3. P. 311–321.
5. Stenn K.S., Paus R. // *Physiol. Rev*. 2001. V. 81. № 1. P. 449–494.
6. Gray J., Dawber R. A Pocketbook of hair and scalp disorders: an illustrated guide. Oxford: Blackwell Science, 1999.
7. Adams J.C., Watt F.M. // *J. Cell Biol*. 1991. V. 115. № 3. P. 829–841.
8. Hertle M., Adams J., Watt F.M. // *Development*. 1991. V. 112. № 1. P. 193–206.
9. Adams J.C., Watt F.M. // *Cell*. 1990. V. 63. № 2. P. 425–435.
10. Palmer E.L., Ruegg C., Ferrando R., Pytela R., Sheppard D. // *J. Cell Biol*. 1993. V. 123. P. 1289–1297.
11. Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M. // *Development*. 1999. V. 126. № 11. P. 2409–2418.
12. Hashmi S., Marinkovich M.P. // *Clin. Dermatol*. 2011. V. 29. № 4. P. 398–411.
13. Stepp M.A. // *Dev. Dyn*. 1999. V. 214. № 3. P. 216–228.
14. Watt F.M. // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 15. P. 3919–3926.
15. Carroll J.M., Romero M.R., Watt F.M. // *Cell*. 1995. V. 83. № 6. P. 957–968.
16. Watt F.M., Kubler M.D., Hotchin N.A., Nicholson L.J., Adams J.C. // *J. Cell Sci*. 1993. V. 106. P. 175–182.
17. Zhu A.J., Haase I., Watt F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 12. P. 6728–6733.
18. Dowling J., Yu Q.C., Fuchs E. // *J. Cell Biol*. 1996. V. 134. № 2. P. 559–572.
19. Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A., LeMeur M. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. № 3. P. 370–373.
20. van der Neut R., Krimpenfort P., Calafat J., Niessen C.M., Sonnenberg A. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. № 3. P. 366–369.
21. Ashton G.H., Sorelli P., Mellerio J.E., Keane F.M., Eady R.A., McGrath J.A. // *Br. J. Dermatol*. 2001. V. 144. № 2. P. 408–414.
22. Germain E.C., Santos T.M., Rabinovitz I. // *Mol. Biol. Cell*. 2009. V. 20. № 1. P. 56–67.
23. Kligys K.R., Wu Y., Hopkinson S.B., Kaur S., Platanius L.S., Jones J.C. // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. № 22. P. 17975–17984.
24. Sehgal B.U., DeBiase P.J., Matzno S., Chew T.L., Claiborne J.N., Hopkinson S.B., Russell A., Marinkovich M.P., Jones J.C. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 46. P. 35487–35498.
25. Hintermann E., Bilban M., Sharabi A., Quaranta V. // *J. Cell Biol*. 2001. V. 153. № 3. P. 465–478.
26. Russell A.J., Fincher E.F., Millman L., Smith R., Vela V., Waterman E.A., Dey C.N., Guide S., Weaver V.M., Marinkovich M.P. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 3543–3556.
27. Fassler R., Meyer M. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 1896–1908.
28. Stephens L.E., Sutherland A.E., Klimanskaya I.V., Andrieux A., Meneses J., Pedersen R.A., Damsky C.H. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 1883–1895.
29. Fässler R., Pfaff M., Murphy J., Noegel A.A., Johansson S., Timpl R., Albrecht R. // *J. Cell Biol*. 1995. V. 128. № 5. P. 979–988.
30. Bagutti C., Wobus A.M., Fassler R., Watt F.M. // *Dev. Biol*. 1996. V. 179. № 1. P. 184–196.
31. Marinkovich M.P., Keene D.R., Rimberg C.S., Burgeson R.E. // *Dev. Dyn*. 1993. V. 197. № 4. P. 255–267.
32. Bagutti C., Hutter C., Chiquet-Ehrismann R., Fässler R., Watt F.M. // *Dev. Biol*. 2001. V. 231. № 2. P. 321–333.
33. Raghavan S., Bauer C., Mundschau G., Li Q., Fuchs E. // *J. Cell Biol*. 2000. V. 150. № 5. P. 1149–1160.
34. Brakebusch C., Grose R., Quondamatteo F., Ramirez A., Jorcano J.L., Pirro A., Svensson M., Herken R., Sasaki T., Timpl R. // *EMBO J*. 2000. V. 19. № 15. P. 3990–4003.
35. Levy L., Broad S., Diekmann D., Evans R.D., Watt F.M. // *Mol. Biol. Cell*. 2000. V. 11. № 2. P. 453–466.
36. <http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab15/Lab15.htm>
37. Hotchin N.A., Gandarillas A., Watt F.M. // *J. Cell Biol*. 1995. V. 128. № 6. P. 1209–1219.
38. Grose R., Hutter C., Bloch W., Thorey I., Watt F.M., Fässler R., Brakebusch C., Werner S. // *Development*. 2002. V. 129. № 9. P. 2303–2315.
39. Lopez-Rovira T., Silva-Vargas V., Watt F.M. // *J. Invest. Dermatol*. 2005. V. 125. № 6. P. 1215–1227.
40. Conti F.J., Rudling R.J., Robson A., Hodiola-Dilke K.M. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 2737–2747.
41. Kreidberg J.A., Donovan M.J., Goldstein S.L., Rennke H., Shepherd K., Jones R.C., Jaenisch R. // *Development*. 1996. V. 122. № 11. P. 3537–3547.
42. DiPersio C.M., Hodiola-Dilke K.M., Jaenisch R., Kreidberg J.A., Hynes R.O. // *J. Cell Biol*. 1997. V. 137. № 3. P. 729–742.
43. DiPersio C.M., van der Neut R., Georges-Labouesse E., Kreidberg J.A., Sonnenberg A., Hynes R.O. // *J. Cell Sci*. 2000. V. 113. P. 3051–3062.
44. Panteleyev A.A., Botchkareva N.V., Sundberg J.P., Cristiano A.M., Paus R. // *Am. J. Pathol*. 1999. V. 155. № 1. P. 159–171.
45. Oro A.E., Scott M.P. // *Cell*. 1998. V. 95. № 5. P. 575–578.
46. van Genderen C., Okamura R.M., Farinas I., Quo R.G., Parslow T.G., Bruhn L., Grosschedl R. // *Genes Dev*. 1994. V. 8. № 22. P. 2691–2703.
47. St-Jacques B., Dassule H.R., Karavanova I., Botchkarev V.A., Li J., Danielian P.S., McMahon J.A., Lewis P.M., Paus R., McMahon A.P. // *Curr. Biol*. 1998. V. 8. № 19. P. 1058–1068.
48. Chiang C., Swan R.Z., Grachtchouk M., Bolinger M., Litingtung Y., Robertson E.K., Cooper M.K., Gaffield W., Westphal H., Beachy P.A. // *Dev. Biol*. 1999. V. 205. № 1. P. 1–10.
49. Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010. V. 11. № 4. P. 288–300.
50. Zhang X., Jiang G., Cai Y., Monkley S.J., Critchley D.R., Sheetz M.P. // *Nat. Cell Biol*. 2008. V. 10. № 9. P. 1062–1068.
51. Choi C.K., Vicente-Manzanares M., Zareno J., Whitmore L.A., Mogilner A., Horwitz A.R. // *Nat. Cell Biol*. 2008. V. 10. № 9. P. 1039–1050.
52. Xu W., Baribault H., Adamson E.D. // *Development*. 1998. V. 125. № 2. P. 327–337.



53. Geiger B., Spatz J.P., Bershadsky A.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 1. P. 21–33.
54. Geiger B., Yamada K.M. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 5. a005033.
55. Turner C.E. // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2. № 12. P. E231–E236.
56. Zamir E., Geiger B. // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114. P. 3577–3579.
57. Frame M.C. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 989–998.
58. Mitra S.K., Hanson D.A., Schlaepfer D.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. № 1. P. 56–68.
59. Legate K.R., Montanez E., Kudlacek O., Fassler R. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 1. P. 20–31.
60. Huttenlocher A., Horwitz A.R. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 9. a005074.
61. Ridley A.J. // *Bioessays.* 1994. V. 16. № 5. P. 321–327.
62. Beckerle M.C., Burridge K., DeMartino G.N., Croall D.E. // *Cell.* 1987. V. 51. P. 569–577.
63. Yu D.H., Qu C.K., Henegariu O., Lu X., Feng G.S. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 33. P. 21125–21131.
64. Hannigan G.E., Leung-Hageteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppelino M.G., Radeva G., Filmus J., Bell J.C., Dedhar S. // *Nature.* 1996. V. 379. P. 91–96.
65. Grashoff C., Thievensen I., Lorenz K., Ussar S., Fässler R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16. № 5. P. 565–571.
66. Yamauchi K., Kurosaka A. // *Arch. Dermatol. Res.* 2010. V. 302. № 4. P. 263–270.
67. Fuchs E., Merrill B.J., Jamora C., DasGupta R. // *Dev. Cell.* 2001. V. 1. № 1. P. 13–25.
68. Huelsenken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., Birchmeier W. // *Cell.* 2001. V. 105. № 4. P. 533–545.
69. Zhou P., Byrne C., Jacobs J., Fuchs E. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 6. P. 700–713.
70. Logan C.Y., Nusse R. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 781–810.
71. Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 19. P. 11211–11216.
72. Novak A., Hsu S.C., Leung-Hageteijn C., Radeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C., Grosschedl R., Dedhar S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 8. P. 4374–4379.
73. Oloumi A., Syam S., Dedhar S. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 59. P. 7747–7757.
74. Sakai T., Li S., Dicheva D., Grashoff C., Sakai K., Kostka G., Braun A., Pfeifer A., Yurchenco P.D., Fässler R. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 7. P. 926–940.
75. Lynch D.K., Ellis C.A., Edwards P.A., Hiles I.D. // *Oncogene.* 1999. V. 18. № 56. P. 8024–8032.
76. Zervas C.G., Gregory S.L., Brown N.H. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 152. № 5. P. 1007–1018.
77. Mackinnon A.C., Qadota H., Norman K.R., Moerman D.G., Williams B.D. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 10. P. 787–797.
78. Hill M.M., Feng J., Hemmings B.A. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 14. P. 1251–1255.
79. Grashoff C., Aszodi A., Sakai T., Hunziker E.B., Fässler R. // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. № 4. P. 432–438.
80. Lorenz K., Grashoff C., Torka R., Sakai T., Langbein L., Bloch W., Aumailley M., Fassler R. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 177. № 3. P. 501–513.
81. Qin J., Wu C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. № 5. P. 607–613.
82. Blanpain C., Fuchs E. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 339–373.
83. Dassule H.R., Lewis P., Bei M., Maas R., McMahon A.P. // *Development.* 2000. V. 127. № 22. P. 4775–4785.
84. Manohar A., Shome S.G., Lamar J., Stirling L., Iyer V., Pumiglia K., DiPersio C.M. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 4043–4054.
85. Nakrieko K.A., Welch I., Dupuis H., Bryce D., Pajak A., St-Arnaud R., Dedhar S., D'Souza S.J., Dagnino L. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 4. P. 1462–1473.
86. Choma D.P., Pumiglia K., DiPersio C.M. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 3947–3959.
87. Nakrieko K.A., Rudkouskaya A., Irvine T.S., D'Souza S.J., Dagnino L. // *Mol. Biol. Cell.* 2011. V. 22. № 14. P. 2532–2540.
88. Judah D., Rudkouskaya A., Wilson R., Carter D.E., Dagnino L. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. e36704.
89. Watt F.M., Driskell R.R. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2010. V. 365. P. 155–163.
90. Hall P.A., Watt F.M. // *Development.* 1989. V. 106. № 4. P. 619–633.
91. Scadden D.T. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 1075–1079.
92. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. // *Nature.* 2001. V. 414. P. 98–104.
93. Watt F.M., Hogan B.L. // *Science.* 2000. V. 287. P. 1427–1430.
94. Morris R.J., Liu Y., Marles L., Yang Z., Trempus C., Li S., Lin J.S., Sawicki J.A., Cotsarelis G. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 4. P. 411–417.
95. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E. // *Science.* 2004. V. 303. P. 359–363.
96. Ordóñez P., Di Girolamo N. // *Stem Cells.* 2012. V. 30. № 2. P. 100–107.
97. Hayashi R., Yamoto M., Saito T., Oshima T., Okano T., Tano Y., Nishida K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 367. № 2. P. 256–263.
98. Li A., Simmons P.J., Kaur P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 7. P. 3902–3907.
99. Wagers A.J., Weissman I.L. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. № 4. P. 1087–1094.
100. Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H.I., Eaves C.J. // *Nature.* 2006. V. 439. P. 993–997.
101. Shackleton M., Vaillant F., Simpson K.J., Stingl J., Smyth G.K., Asselin-Labat M.L., Wu L., Lindeman G.J., Visvader J.E. // *Nature.* 2006. V. 439. P. 84–88.
102. Watt F.M., Fujiwara H. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 4. a005124.
103. Jones P.H., Watt F.M. // *Cell.* 1993. V. 73. № 4. P. 713–724.
104. Huttenlocher A., Sandborg R.R., Horwitz A.F. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. № 5. P. 697–706.
105. Kloepper J.E., Tiede S., Brinckmann J., Reinhardt D.P., Meyer W., Faessler R., Paus R. // *Exp. Dermatol.* 2008. V. 7. № 7. P. 592–609.
106. Kloepper J.E., Hendrix S., Bodo E., Tiede S., Humpries M.J., Philpott M.P., Fässler R., Paus R. // *Exp. Cell Res.* 2008. V. 314. № 3. P. 498–508.
107. Sachs N., Secades P., van Hulst L., Kreft M., Song J.Y., Sonnenberg A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 52. P. 21468–21473.
108. Lechler T., Fuchs E. // *Nature.* 2005. V. 437. P. 275–280.
109. Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G., Defilippi P. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 22. P. 6622–6632.

УДК 577

# Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы

А. В. Лахин\*, В. З. Тарантул, Л. В. Генинг

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

\*E-mail: lahin9@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2013

**РЕФЕРАТ** Аптамеры – короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы. Когда почти четверть века назад была разработана технология получения аптамеров, сразу же предположили, что она может послужить революционизирующим началом для решения многих проблем диагностики и терапии разнообразных заболеваний. Многочисленные попытки практического использования аптамеров, хотя и были иногда успешными, однако в целом результаты оказались значительно скромнее, чем ожидалось. Настоящий обзор посвящен главным образом не успехам в использовании аптамеров, а тем проблемам, которые затрудняют их широкое применение в терапии и диагностике, и тем подходам, которые могут существенно повлиять на расширение областей применения аптамеров.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** SELEX, аптамер, диагностика, терапия, проблемы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИОП – исходный олигонуклеотидный пул; миРНК – малые интерферирующие РНК; НК – нуклеиновая кислота; PEG – полиэтиленгликоль; SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment.

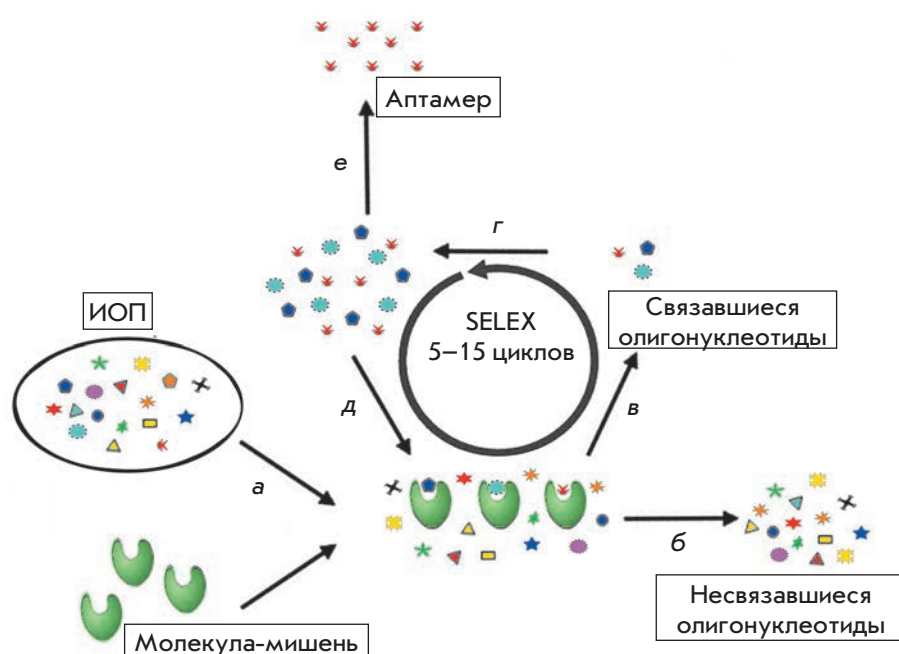
## ВВЕДЕНИЕ

Долгое время нуклеиновые кислоты (НК) рассматривались лишь как химические соединения, основными функциями которых являются хранение наследственной информации (ДНК) и передача этой информации от гена к белку (РНК). Однако со временем начали появляться сведения о способности НК к выполнению других специфических функций, таких, как ферментативный катализ (рибозимы) и регуляция процессов транскрипции. Подобных примеров обнаруживалось все больше и больше, что заставило ученых пересмотреть свое первоначальное отношение к функциям НК. В результате на основании имеющихся данных была сформулирована теория мира РНК («The RNA world theory») [1, 2]. Согласно этой теории, НК потенциально способны к выполнению самых разнообразных функций и, вероятно, обеспечивали все необходимые каталитические реакции во времена зарождения жизни [3]. Весомым вкладом в подтверждение многофункциональности НК стало и обнаружение олигонуклеотидов, способных специфически связываться с разнообразными молекулами-мишенями. Эти олигонуклеотиды получили название аптамеры [4, 5].

Аптамеры представляют собой небольшие (обычно от 20 до 60 нуклеотидов) одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться

с молекулой-мишенью. К настоящему моменту получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням, начиная от простых неорганических молекул и заканчивая сложными белковыми комплексами и целыми клетками. По сути, аптамеры представляют собой нуклеотидные аналоги антител, однако, получение аптамеров – процесс значительно более простой и существенно менее дорогостоящий, чем получение антител [6, 7]. Кроме того, аптамеры не обладают иммуногенностью и токсичностью [8]. Все это делает аптамеры идеальными кандидатами для применения в терапии, диагностике, очистке молекул-мишеней из сложных смесей, создании биосенсоров и др. [9, 10]. Области применения аптамеров настолько обширны и разнообразны, что новые работы, посвященные их применению, публикуются почти каждый день. Для систематизации огромного объема получаемой информации создана специализированная база данных, позволяющая быстро найти всю необходимую информацию по многим известным аптамерам (<http://aptamer.icmb.utexas.edu>).

Основы современной технологии получения аптамеров были впервые описаны более 20 лет назад [11, 12]. Обычно аптамеры отбирают из олигонуклеотидного пула, называемого исходным олигонуклеотидным пулом (ИОП), который содержит  $10^{14}$ – $10^{15}$  вариантов олигонуклеотидов. Довольно часто ИОП называют комбинаторной библиотекой, что не со-



**Рис. 1.** Схема процедуры отбора аптамеров SELEX: а – инкубация исходного пула олигонуклеотидов с молекулой-мишенью; б – удаление несвязавшихся олигонуклеотидов; в – отделение связавшихся олигонуклеотидов от молекулы-мишени; г – амплификация элюированных олигонуклеотидов в ходе не-симметричной ПЦР (ДНК-SELEX) или ОТ-ПЦР с последующей транскрипцией (РНК-SELEX); д – инкубация обогатившегося пула с молекулой-мишенью; е – клонирование аптамеров, полученных после проведения 5–15 раундов SELEX

всем корректно, поскольку библиотека, по определению содержащая набор всех возможных вариантов олигонуклеотидов, слишком огромна для практического использования (в относительно небольшой библиотеке это как минимум  $10^{18}$  вариантов олигонуклеотидов). ИОП представляет собой аликвоту химически синтезированной комбинаторной библиотеки и содержит определенным образом подготовленные для связывания с молекулой-мишенью олигонуклеотиды в виде одноцепочечных ДНК или РНК. Олигонуклеотиды в составе ИОП включают в себя переменный участок длиной 30–50 нуклеотидов (в каждом положении может находиться любой из четырех нуклеотидов). Переменный участок фланкирован константными участками, позволяющими осуществлять с олигонуклеотидами все необходимые манипуляции, такие, как амплификация и транскрипция. Следует отметить, что РНК-аптамеры по сравнению с ДНК-аптамерами обеспечивают образование значительно большего структурного разнообразия, хотя их применение и сопряжено с определенными трудностями (молекулы РНК легко деградируют под воздействием разнообразных факторов, таких, как РНКазы, высокая температура, щелочная среда и т.д.) [13, 14].

Классическая процедура получения аптамеров, названная SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), условно состоит из двух чередующихся этапов (рис. 1). Первый этап заключается в амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) имеющихся олигонуклеотидов до нужной концентрации. В случае отбора РНК-

аптамеров пул одноцепочечных олигорибонуклеотидов получают в результате транскрипции *in vitro* двухцепочечной ДНК с использованием Т7-РНК-полимеразы. При отборе ДНК-аптамеров пул одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов получают разделением цепей двухцепочечных продуктов ПЦР. На втором этапе амплифицированный пул инкубируют с молекулой-мишенью и олигонуклеотиды, образовавшие с ней комплекс, используют для первого этапа следующего цикла SELEX [7, 15].

Отбор олигонуклеотидов с большей аффинностью и отделение несвязавшихся с молекулой-мишенью олигонуклеотидов с меньшей аффинностью происходит благодаря жесткой конкуренции за место связывания. С каждым раундом SELEX давление отбора увеличивается, в результате в среднем через 5–15 циклов образуется максимально обогащенный пул, содержащий аптамеры с наибольшим сродством к молекуле-мишени [16, 17]. Технология SELEX применима не только для отбора аптамеров, способных связываться с молекулой-мишенью, но и для отбора олигонуклеотидов, обладающих определенной ферментативной активностью. В данном случае критерием отбора служит способность аптамера катализировать такую реакцию [18, 19].

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АПТАМЕРОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

С использованием аптамеров связан ряд проблем, на что и обращено основное внимание в нашем обзоре. Рассмотрим основные трудности, мешающие широкому практическому применению аптамеров.



**Проблема № 1. Дегградация аптамеров**

Серьезной проблемой использования аптамеров для практических целей (особенно РНК-аптамеров) является их быстрая дегградация нуклеазами в биологических средах, в частности в сыворотке крови. Так, для распада олигонуклеотида в крови требуется в среднем от нескольких минут до нескольких десятков минут в зависимости от конформационной структуры олигонуклеотида и его концентрации. Поскольку данный промежуток времени мал и неприемлем для большинства терапевтических целей, то разработан ряд приемов, направленных на защиту аптамера от дегградации нуклеазами.

Один из стандартных способов получения устойчивых к нуклеазам аптамеров – проведение процедуры SELEX с олигонуклеотидами, в состав которых входят модифицированные нуклеотиды (рис. 2). В основе получения таких олигонуклеотидов лежит применение специальных ДНК- или РНК-полимераз, способных в качестве субстрата использовать, например, модифицированные по 2'-положению сахара нуклеозидтрифосфаты. В настоящий момент с этой целью успешно применяют 2'-аминопиримидиннуклеозиды [20, 21], 2'-фторпиримидиннуклеозиды [22, 23], 2'-О-метилпурииннуклеозиды и 2'-О-метилпиримидиннуклеозиды [24, 25]. Наглядным примером использования некоторых модификаций нуклеотидов может служить единственный разрешенный к применению в медицинской практике аптамер, известный как Macugen (рис. 3) [26]. Модификация нуклеотидов может быть проведена и после процедуры SELEX непосредственно в составе аптамера, но в этом случае дополнительные функциональные группы могут повлиять на специфичность и аффинность связывания аптамера. Тем не менее некоторые модификации способны увеличивать устойчивость аптамеров к нуклеазам и при этом не влиять на параметры связывания с молекулой-мишенью. Самой распространенной и эффективной модификацией подобного рода является модификация терминальных 3'- и 5'-нуклеотидов в олигонуклеотидах [27]. Аптамеры, вообще не содержащие модифицированных нуклеотидов, иногда также могут проявлять очень хорошую устойчивость к дегградации нуклеазами в сыворотке крови [28]. Это свойство, по видимому, обусловлено образованием специфических трехмерных структур, экранирующих 3'- и 5'-концы аптамера от доступа к ним экзонуклеаз.

Хорошей устойчивостью к нуклеазному расщеплению обладают замкнутые в кольцо аптамеры, полученные в ходе лигирования 3'- и 5'-концов одного и того же аптамера. Замыкаться могут и несколько различных аптамеров, что обеспечивает множественную специфичность такой конструкции [29, 30].

Модификация 5'-конца  
(устойчивость к 5'-экзонуклеазам)



Рис. 2. Основные модификации нуклеотидов в аптамерах, обеспечивающие устойчивость аптамеров к дегградации нуклеазами

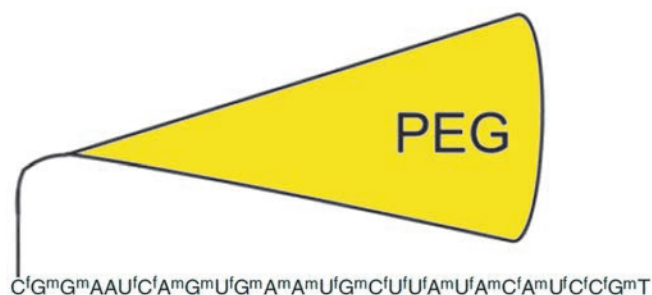
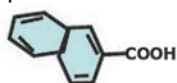


Рис. 3. Структура первого разрешенного к клиническому применению аптамера Macugen. Используются следующие модификации нуклеотидов: f – 2'-фторнуклеотид, m – 2'-О-метилнуклеотид. Чтобы избежать быстрого выведения аптамера через почки, к нему на 5'-конце добавлен PEG массой 40 кДа [26]

Подобный подход создания кольцевых аптамеров оптимален в тех случаях, когда может потребоваться систематическое введение в организм больших доз аптамера. Связано это с тем, что аптамеры, содержащие некоторые модификации нуклеотидов, при дегградации потенциально могут образовывать вещества, обладающие определенной токсичностью [31].

Оригинальным подходом к решению проблемы нуклеазной дегградации аптамеров стало получение зеркально отображенных аптамеров – шпигельмеров (Spiegelmer), в которых олигонуклеотидный остов полностью состоит из L-рибозы (РНК-шпигельмеры) или L-дезоксирибозы (ДНК-шпигельмеры). Их создание основано на том факте, что нуклеа-

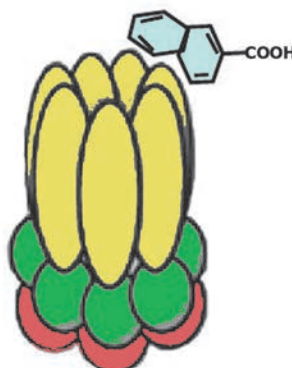
Низкомолекулярное  
соединение



Аптамер



Белок-мишень



**Рис. 4.** Метод поиска веществ, вытесняющих аптамер из места связывания (aptamer displacement screening). В ходе данной процедуры из большого количества разнообразных низкомолекулярных соединений отбираются молекулы, способные конкурировать с аптамером за место связывания

зы способны эффективно расщеплять только *D*-, а не *L*-олигонуклеотиды, которые в природе не встречаются. Однако, если аптамер с известной первичной структурой просто синтезировать из *L*-нуклеотидов, то такой аптамер будет способен связываться лишь с несуществующим в природе энантиомерным белком, содержащим *D*-аминокислоты. Для решения данной проблемы предложено сначала отбирать аптамеры, в состав которых входят *D*-нуклеотиды к синтезированному (*D*)-белку. Затем, определив первичную структуру полученных аптамеров, их можно синтезировать в виде шпигельмеров, которые будут связываться уже с (*L*)-белком-мишенью, встречающимся в организме. Такие шпигельмеры обладают крайне высокой стабильностью и почти не поддаются ферментативной деградации [32, 33].

Избежать проблем с деградацией аптамеров позволяет и недавно разработанный метод «aptamer displacement screening», заключающийся в скрининге низкомолекулярных соединений, способных вытеснять аптамер из места его связывания с белком-мишенью (рис. 4). Предполагается, что отобранное в результате этой процедуры вещество будет обладать той же специфичностью и аффинностью. Показано, что полученные таким образом низкомолекулярные соединения часто оказывают такое же ингибирующее действие на белок-мишень, как и аптамеры [34, 35].

### Проблема № 2. Выведение аптамеров из кровотока в результате почечной фильтрации

Серьезную проблему для применения аптамеров в терапии представляет их удаление из кровотока в ходе

почечной фильтрации. Поскольку масса большинства аптамеров находится в пределах 5–15 кДа (15–50 нуклеотидов), то они быстро выводятся почками, способными удалять вещества массой до 30–50 кДа. Самым распространенным решением данной проблемы является конъюгирование аптамеров с полиэтиленгликолем (PEG) массой 20 или 40 кДа (рис. 3). В настоящее время конъюгирование с PEG широко применяется для увеличения времени циркуляции в кровотоке не только олигонуклеотидов, но и белков, пептидов и низкомолекулярных соединений [36, 37]. Показано, что конъюгированные с PEG аптамеры выводятся из кровотока значительно медленнее (до нескольких дней) и при этом не теряют свою специфичность. Кроме того, такие конъюгированные аптамеры более эффективно распределяются по тканям и органам [38, 39]. Альтернативный вариант решения проблемы почечной фильтрации – конъюгирование аптамеров с молекулами холестерина, что также значительно увеличивает время их циркуляции в кровотоке [40].

### Проблема № 3. Контроль времени действия аптамеров

Крайне важным условием применения любого препарата в терапии является его фармакокинетика и, в частности, время действия, всегда обусловленное многочисленными факторами, такими, как деградация, вовлеченность в различные метаболические процессы, выведение почками и т.д. Все эти факторы должны учитываться перед назначением препарата, что порой сильно ограничивает его применение. Использование аптамеров в качестве терапевтических

средств способно во многих случаях решить данную проблему. Этого можно достичь, например, за счет создания антитодов к аптамерам. Такие антитоды имеют комплементарную аптамеру нуклеотидную последовательность. В результате гибридизации антитода с аптамером происходит нарушение конформационной структуры аптамера, что обуславливает полную потерю его способности взаимодействовать с молекулой-мишенью (рис. 5). Данный подход показал свою эффективность в ряде исследований, в ходе которых аптамер вводился в кровоток животных и оказывал терапевтический эффект, а последующее введение антитода быстро инактивировало аптамер, прекращая его действие [41, 42]. Высокая эффективность процессов гибридизации аптамеров с антитодами в сыворотке крови дает уникальную возможность контролировать время терапевтического действия, ставя данную технологию выше применения антител или низкомолекулярных соединений, контролировать продолжительность действия которых либо невозможно, либо крайне сложно.

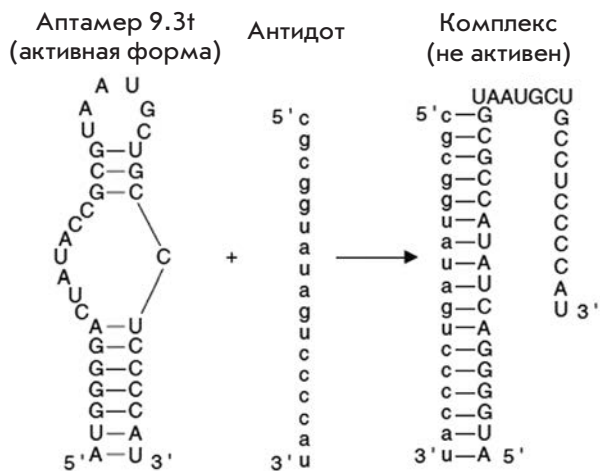
Еще один эффективный и дешевый способ контроля активности аптамеров в кровотоке, при котором не требуется создавать свой антитод для каждого аптамера, – применение поликатионных биополимеров, эффективно связывающих полианионные молекулы олигонуклеотидов [43, 44]. Спо-

собностью связывать НК обладают многие полимеры, первоначально предназначенные для доставки плазмидной ДНК или миРНК при проведении генной терапии [45, 46]. Некоторые низкомолекулярные вещества, такие, как порфирины, также могут связываться с определенными конформационными структурами, инактивируя тем самым аптамер [47]. Поскольку плазма крови не содержит значимые количества нуклеиновых кислот, быстро деградирующих под действием нуклеаз, то предполагается, что с биополимерами будут связываться только введенные в кровоток чужеродные НК, такие, как аптамеры.

Другой способ контроля работы аптамеров – их активация в необходимый момент, т.е. перевод аптамера из неактивной формы в активную. Так, неактивный аптамер, содержащий нуклеотиды с определенными фоточувствительными модификациями, не обладает способностью связываться с молекулой-мишенью. Облучение аптамеров светом определенной длины волны приводит к отщеплению этих фоточувствительных групп от нуклеотидов, делая аптамер полностью функциональным. Это также позволяет контролировать не только время активации аптамера, но и место его активации [48, 49].

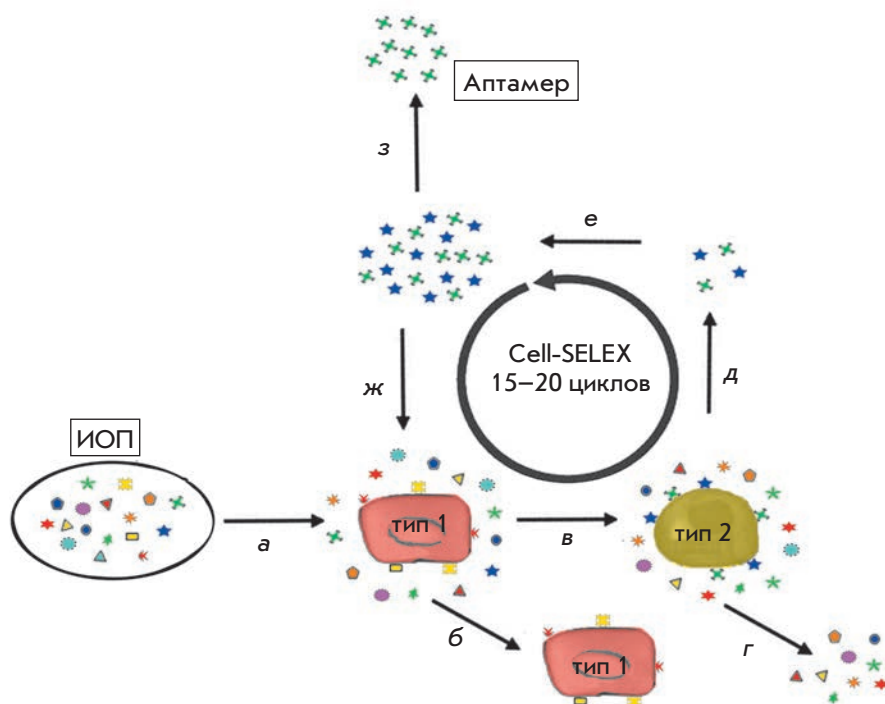
#### Проблема № 4. Взаимодействие аптамеров с внутриклеточными мишенями

Большинство описанных аптамеров отобраны на мишени, находящиеся на поверхности клеток или непосредственно в кровотоке. В перспективе это может существенно облегчить их применение, поскольку для получения терапевтического результата необходимо только ввести аптамер в кровоток. Однако в последнее время достигнуты определенные успехи в разработке способов доставки аптамеров внутрь клетки. Одним из перспективных подходов в данной области является применение специальных систем экспрессии, способных эффективно производить аптамер в нужных концентрациях в самой клетке с последующим их накоплением либо в нуклеоплазме, либо в цитоплазме. Например, экспрессия аптамеров в клетках, трансфицированных рекомбинантным вектором с кодирующими аптамер нуклеотидными последовательностями под промотором U6, способна обеспечить специфическую инактивацию внутриядерных белков-мишеней [50, 51]. Экспрессия аптамеров с помощью промотора одной из тРНК обеспечивает их преимущественную цитоплазматическую локализацию [52]. Синтез аптамеров в клетках определенного типа могут обеспечить вирусные экспрессионные системы за счет их направленной доставки в клетки [53, 54]. Повысить концентрацию экспрессирующихся внутри клетки аптамеров (на-



**Рис. 5.** Регуляция функционирования аптамера с помощью антитода. В качестве примера приведен аптамер 9.3t, полученный в работе [77], который взаимодействует с фактором свертываемости крови IXa и обладает антикоагуляционным действием. Добавление комплементарного антитода приводит к быстрой инактивации аптамера и восстановлению способности крови сворачиваться





**Рис. 6.** Схема Cell-SELEX: а – инкубация ИОП с клетками типа 1, с которыми полученные аптамеры не должны связываться – негативная селекция; б – удаление связавшихся с клетками типа 1 олигонуклеотидов; в – инкубация олигонуклеотидов, не связавшихся с клетками типа 1, с клетками типа 2 – позитивная селекция; г – удаление не связавшихся с клетками типа 2 олигонуклеотидов; д – отделение связавшихся олигонуклеотидов от клеток типа 2; е – амплификация элюированных олигонуклеотидов в ходе несимметричной ПЦР (ДНК-SELEX) или ОТ-ПЦР с последующей транскрипцией (РНК-SELEX); ж – инкубация обогащенного пула с клетками типа 1; з – клонирование аптамеров, полученных после проведения 15–20 раундов Cell-SELEX

зываемых также интрамерами) можно не только за счет высокого уровня экспрессии, обеспечиваемого сильным промотором, но и в результате снижения скорости нуклеазной деградациии интрамера (экранирование 3'- и 5'-концов с помощью таких дополнительных структурных элементов, как, например, шпильки) [50].

Другой подход к решению проблемы взаимодействия аптамеров с внутриклеточными молекулами-мишенями – проникновение аптамеров в клетки из кровотока в результате рецептор-зависимого эндоцитоза [55, 56]. Например, аптамеры, связывающиеся с простат-специфичным мембранным антигеном (prostate-specific membrane antigen, PSMA), позволяют за счет их эндоцитоза эффективно и избирательно доставлять конъюгированные терапевтические агенты в клетки опухолей, содержащих на своей поверхности такие антигены [57, 58].

**Проблема № 5. Получение аптамеров к неочищенным белкам-мишеням**

В большинстве случаев для получения аптамеров необходимо присутствие очищенных молекул-мишеней. Если этой молекулой-мишенью является белок, то его необходимо экспрессировать в культуре клеток, а затем очистить из экстракта в ходе таких процедур, как аффинная хроматография. Все это весьма трудоемко и требует много времени, что негативно сказывается на скорости получения

аптамеров. Кроме того, некоторые белки в силу их физико-химических свойств крайне сложно выделить. Существуют также данные, указывающие на то, что аптамеры, подобранные к экспрессированным в клетках прокариот белкам-мишеням, не всегда способны взаимодействовать с теми же белками, но синтезированными в эукариотических клетках. Это связано с тем, что многие эпитопы эукариотических белков вследствие посттрансляционных модификаций могут быть недоступны для взаимодействия с аптамерами, полученными к белкам в прокариотической клетке [59].

Если белок-мишень находится на поверхности клеток, то одним из подходов к решению этой проблемы может быть модификация процедуры SELEX, позволяющая вести отбор к целым клеткам – Cell-SELEX [60, 61] (рис. 6). В этом варианте отбирают аптамеры на специфические белковые маркеры, расположенные непосредственно на поверхности живых клеток. Можно отбирать аптамеры и на специфические маркеры целых организмов. Например, получены аптамеры, позволяющие избирательно выявлять присутствие в организме тех или иных паразитов, таких, как трипаносомы [62, 63]. В основе Cell-SELEX лежит дополнительный этап процедуры отбора аптамеров – негативная селекция, проводимая к мишени (как правило, родственная клеточная линия), с которой не должны связываться финальные аптамеры. Одно из преи-

мушеств Cell-SELEX состоит в том, что для отбора аптамеров не нужна информация по белковым маркерам, специфичным для клеток данного типа. Если негативный отбор ведется на нормальных клетках, а позитивный – на тех же клетках, только трансформированных, то все получаемые аптамеры будут связываться с маркерными белками опухолевых клеток этого типа. Данное достижение очень важно, поскольку одна из главнейших задач настоящего времени – разработка методов ранней диагностики опухолевых клеток.

В основе онкологических заболеваний лежат генетические изменения, которые возникают в результате мутаций и приводят к изменениям сначала на молекулярном (паттерны экспрессии белков) и лишь затем на морфологическом уровне. Классические методы диагностики рака основаны преимущественно на изменениях в морфологии клеток и тканей, что часто не позволяет выявлять онкологические заболевания на ранних стадиях. С данной задачей способны эффективно справиться аптамеры, полученные к опухолевым клеткам в результате Cell-SELEX. Такие аптамеры, размещенные на микрочипах, позволяют обнаруживать в крови даже крайне незначительное содержание злокачественных клеток [64, 65]. Аптамеры, отобранные на конкретные белковые опухолевые маркеры и конъюгированные с частицами золота, эффективно применяются в качестве контрастных агентов для выявления определенных типов рака [66, 67].

Разработаны также подходы к отбору аптамеров к внутриклеточным белкам-мишеням, находящимся в экстрактах клеток [68, 69]. Если относительное содержание интересующего белка в исходном экстракте мало, то в процедуру SELEX обязательно должна быть включена стадия негативного отбора с экстрактами близкородственных клеток, в которых данный белок отсутствует. В результате олигонуклеотидный пул будет обогащаться только теми аптамерами, которые связываются с белками, представленными в исходном экстракте, но отсутствуют в экстракте негативного контроля. Кроме того, если содержание целевого белка в экстракте высоко и составляет 1–10% от всех белков, то SELEX может не включать стадию негативного отбора, что существенно упрощает получение аптамеров [68, 69]. Такая модификация процедуры SELEX потенциально позволяет в минимальные сроки получить аптамеры к уникальным для исследуемого типа клеток внутриклеточным белкам. Затем с помощью аптамеров и аффинной хроматографии можно выделить из экстрактов целевые белки в нативном виде и охарактеризовать их [70]. Это может оказаться полезным при изучении свойств очищенных ферментов, по-

скольку в рекомбинантных белках дополнительные части (GST-, His-теги и др.) могут непредсказуемо сказаться на свойствах белка [71].

Одним из наиболее новых и перспективных подходов к решению проблемы получения аптамеров к белкам-мишеням, специфичным для конкретной ткани, является *in vivo* SELEX [72]. В ходе данной процедуры устойчивый к нуклеазному расщеплению пул олигонуклеотидов вводится непосредственно в кровоток организма, содержащего ткань определенного типа, например опухоль. Спустя заданное время эту ткань извлекают и экстрагируют из нее олигонуклеотиды, которые амплифицируют и затем снова вводят в целевой организм. Эту процедуру повторяют несколько раз и в результате получают набор аптамеров, способных специфично в условиях *in vivo* мигрировать и накапливаться в тканях определенного типа. Многие аптамеры, полученные таким способом, обладают также способностью проникать в клетки и связываться с внутриклеточными мишенями [72]. Огромным преимуществом *in vivo* SELEX является то, что в результате отбираются только те аптамеры, которые не только специфически связываются с определенной тканью, но и способны избежать неспецифического связывания с белками клеточных стенок и компонентами сложной белковой смеси в крови.

#### Проблема № 6. Кросс-реактивность аптамеров

Несмотря на потенциально высокую специфичность, аптамеры к определенным молекулам-мишеням могут связываться и с некоторыми другими структурно родственными молекулами. Так, в нашей лаборатории получены четыре аптамера к ДНК-полимеразе  $\beta$  [73], которые, помимо связывания с самой ДНК-полимеразой  $\beta$  и ингибирования ее активности, связывались также с ДНК-полимеразой  $k$ , принадлежащей другому семейству эукариотических ДНК-полимераз, и также ингибировали ее активность. Кросс-реактивность может стать серьезным препятствием для использования аптамеров в терапии из-за возможного побочного действия, обусловленного взаимодействием аптамеров с другими белками. Тем не менее можно предположить, что более продуманная процедура SELEX, включающая, например, этапы негативного отбора к родственным молекулам, вполне способна обеспечить создание аптамеров с необходимой специфичностью. Отчасти данное предположение подтверждают результаты, полученные в нашей лаборатории. С использованием более жесткого проведения SELEX получен аптамер к ДНК-полимеразе  $\iota$ , обладающий высокой специфичностью и не связывающийся ни с ДНК-полимеразой  $k$ , ни с ДНК-полимеразой  $\beta$  [74].

### Проблема № 7. Автоматизация получения аптамеров

Несмотря на внешне относительную методическую простоту, процесс получения аптамеров достаточно трудоемкий и длительный. Кроме того, довольно часто возможен отбор не самых аффинных и специфичных аптамеров, что случается из-за недостаточной оптимизации некоторых этапов SELEX. Для решения данных проблем предпринимаются довольно успешные попытки полностью автоматизировать SELEX [75, 76]. В результате у исследователя появляется возможность получения аптамеров с заданными свойствами в течение всего лишь нескольких дней.

Кроме того, разработаны методики, позволяющие получать аптамеры всего за один раунд отбора. Эта процедура получила название CE-SELEX (capillary electrophoresis SELEX), в основе которой лежит модифицированная стадия отделения связанных с белком-мишенью аптамеров от несвязанных. Фракционирование происходит в результате неравновесного капиллярного электрофореза равновесных смесей (nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM) и позволяет не только ускорить всю процедуру отбора до 1–2 дней, но также получить аптамеры со строго заданными параметрами связывания, такими, как  $K_d$ ,  $K_{off}$  и  $K_{on}$  [77, 78].

### СОВРЕМЕННОЕ ПОЛОЖЕНИЕ АПТАМЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ

Моно- и поликлональные антитела в настоящее время являются незаменимыми инструментами в диагностике разнообразных заболеваний. Однако во многих случаях, когда требуется эффективное и специфичное взаимодействие с молекулой-мишенью (диагностируемым маркером), аптамеры уже сейчас успешно заменяют антитела [79, 80]. Например, разработаны протоколы, позволяющие с помощью аптамеров со значительно большей эффективностью, чем при использовании антител в Вестерн-блоттинге, детектировать иммобилизованные на мембране белки [81, 82]. Использование аптамеров вместо антител в процедурах типа ELISA не только упрощает обнаружение белка, но и обеспечивает гораздо большую чувствительность [83, 84]. С помощью иммобилизованных аптамеров, как и с помощью антител, можно выделять белки-мишени [85, 86]. Одно из преимуществ аптамеров над антителами состоит в том, что аптамеры можно отбирать к неиммуногенным или высокотоксичным веществам [87, 88].

Аптамеры также применяются при создании биосенсоров в качестве распознающих элементов [89, 90]. Небольшой размер аптамеров (в 10–100 раз меньше антител) позволяет разместить на поверх-

ности биосенсоров значительно большее их количество на меньшей площади. Это увеличивает эффективность обнаружения различных белково-биомаркеров при использовании значительно меньшего количества диагностируемой жидкости, такой, например, как сыворотка крови. Кроме того, биосенсоры на основе аптамеров могут использоваться не один раз, а многократно, без потери чувствительности [91, 92], что обусловлено присущей всем нуклеиновым кислотам способностью к денатурации и ренатурации.

Низкая стоимость производства, отсутствие иммуногенности и возможность проводить различные модификации сделали аптамеры крайне перспективными кандидатами для применения в качестве терапевтических средств. Основа использования аптамеров в данной области – способность ингибировать ферментативную активность того белка-мишени, с которым связался аптамер. Ингибирование ферментативной активности может быть обусловлено как взаимодействием аптамера с активным центром фермента, так и в результате спровоцированных взаимодействием с аптамером конформационных изменений в структуре белка [93, 74]. Однако взаимодействие с аптамером не всегда приводит к ингибированию фермента. Иногда наблюдается обратная ситуация: фермент переходит из неактивной формы в активную [94, 95], что обусловлено сходством действия аптамера и активирующего лиганда по отношению к белку.

Аптамеры активно пытаются использовать и для лечения вирусных инфекций. К настоящему моменту получены аптамеры ко многим белкам таких вирусов, как вирус иммунодефицита человека, вирусы гепатита С, гриппа и др. [96, 97]. Несмотря на эффективность связывания и ингибирования многих жизненно важных вирусных белков (обратные транскриптазы, интегразы и др.), не до конца решенной остается проблема эффективной доставки аптамера или аптамерэкспрессирующего вектора в клетку. Иная ситуация наблюдается при применении аптамеров, связывающихся с белками вирусного капсида. Показано, что такое связывание приводит к подавлению способности вируса взаимодействовать с рецепторными белками клетки и, следовательно, проникать внутрь клетки [98, 99]. В данном случае возможная профилактика или терапия вирусной инфекции сильно упрощается и может заключаться либо в обработке участков кожи, через которые проникает вирус, аптамерсодержащим раствором или мазью (так называемые микробициды), либо во внутривенном введении аптамера.

Конъюгирование аптамеров, полученных к белковым маркерам клеток определенного типа, с те-



рапевтическим агентом также предоставляет ряд уникальных возможностей. Одна из таких возможностей – доставка лекарственного средства непосредственно к тому типу клеток, который несет на поверхности специфические белковые маркеры. В качестве терапевтического агента могут быть применены:

а) крайне токсичные вещества, не позволяющие применять их в высоких терапевтических дозах. Конъюгированные с аптамером и введенные в низких концентрациях, токсины будут накапливаться строго в определенном месте (например, в опухоли) и создавать в этом месте необходимую терапевтическую концентрацию. К этой группе можно отнести радиоактивные и высокотоксичные вещества [100, 101];

б) быстро деградирующие и быстро выводятся вещества, такие, как миРНК. Доставка миРНК в ткань определенного типа за счет аптамера способна решить одно из главных ограничений их применения в терапии [102, 103];

в) наночастицы, активно исследуемые в качестве потенциальных переносчиков лекарственных средств в район опухоли. На животных моделях показана низкая эффективность доставки лекарственных средств в опухолевую ткань с использованием конъюгированных наночастиц с антителами. Это связано с тем, что в кровотоке такие крупные конъюгаты быстро поглощаются фагоцитарной системой и, кроме того, проявляют низкую способность к проникновению в твердые опухоли. Эти проблемы могут быть решены при использовании аптамеров, конъюгированных с наночастицами, за счет их гораздо меньшего размера и соответственно большей проникающей способности [104, 105]. Применение аптамеров, конъюгированных с липосомами, для направленной доставки терапевтических средств в опухолевые клетки представляется наиболее перспективным направлением в данной области, и к настоящему моменту в некоторых случаях оно показало свою высокую эффективность [106, 107];

г) эндогенные ферменты. Конъюгирование ферментов с аптамерами может оказаться крайне полезным для доставки в те клетки, в которых эти ферменты либо отсутствуют, либо не работают должным образом, с последующим потенциальным восстановлением функций клеток [108].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аптамеры представляют собой особый класс соединений, обладающих набором уникальных свойств, они характеризуются преимуществами, присущими как низкомолекулярным агентам, так и агентам белковой природы. Например, аптамеры обладают аффинностью и специфичностью, не уступающей

моноклональным антителам. В то же время благодаря малому размеру аптамеры проявляют высокую проникающую способность и не обладают иммуногенностью, что присуще низкомолекулярным веществам. Тем не менее аптамеры до сих пор не получили широкого применения. За двадцать с лишним лет, прошедшие со времени разработки процедуры SELEX, разрешение на использование в медицинской практике получил лишь один аптамер, известный как Macugen, или Pegaptanib (рис. 3). Этот аптамер связывается с фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF), блокируя рост аномальных кровеносных сосудов глаза и предотвращая кровоизлияния и потерю зрения [26, 109].

Принимая во внимание все достоинства аптамеров, странной может показаться незначительная их доля среди современных терапевтических препаратов. Однако стоит учитывать, что аптамеры представляют собой довольно новый класс веществ, а разработка всевозможных протоколов, направленных на адаптацию аптамеров к тем или иным задачам, занимает много времени. Подобная ситуация наблюдалась и в случае широко распространенных сегодня антител. Моноклональные антитела были получены в 1975 году, но лишь в 1986 году первый препарат на основе антител был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами (FDA, Food and Drug Administration, США). В 1994 году поступил в продажу второй препарат и только после этого начался их широкомасштабный выпуск (сейчас разрешено применение в терапии порядка двух десятков антител). Выходу любого препарата в продажу всегда предшествует этап всевозможных клинических испытаний, часто продолжающийся более 10 лет. Проведение многочисленных клинических испытаний требует огромных затрат и может быть обеспечено лишь очень крупными фармакологическими компаниями, способными затрачивать сотни миллионов долларов на исследования. Однако стоит отметить, что за первый же год после появления препарата Macugen на рынке (2005 г.) его было продано на сумму свыше 200 млн долларов. Этот факт служит хорошим стимулом для интенсификации исследований и создания новых лекарственных препаратов на основе аптамеров.

Применение аптамеров в диагностике имеет значительно меньшие ограничения, чем в терапии, поскольку отсутствует непосредственная угроза здоровью людей. На наш взгляд, основным препятствием широкому распространению аптамеров в данной области является отсутствие стандартизации аптамеров в разрабатываемых протоколах. Так, полученные в разных лабораториях аптамеры к одной и той же молекуле-мишени, помимо различий в первичной

структуре, почти наверняка будут различаться и такими параметрами, как аффинность, специфичность и другие кинетические характеристики. Поэтому разработанный протокол при использовании одного аптамера может давать полностью адекватные результаты, в случае второго аптамера результаты могут быть менее достоверными. Это особенно актуально в диагностике различных заболеваний человека, где некорректные результаты анализов могут привести к весьма нежелательным последствиям. В условиях постоянно снижающейся стоимости химического синтеза нуклеиновых кислот и наличия баз данных аптамеров ко все возрастающему числу молекул-мишеней оптимальной стратегией становится не получение нового аптамера, а синтез и использование уже описанного. Можно надеяться, что выявление

конкретной молекулы-мишени с помощью только одного аптамера с наилучшими параметрами связывания в скором будущем обусловит широкое применение аптамеров в диагностике.

К настоящему моменту найдено то или иное решение почти всех проблем, возникающих при работе с аптамерами. Поэтому можно предположить, что благодаря ряду уникальных свойств аптамеры в скором времени займут достойное место как в наборе инструментов современного ученого, так и среди терапевтических и диагностических препаратов. ●

*Работа поддержана программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и РФФИ (гранты № 13-04-00598 и 13-04-00642).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gilbert W. // Nature. 1986. V. 319. P. 618.
- Gold L., Janjic N., Jarvis T., Schneider D., Walker J.J., Wilcox S.K., Zichi D. // Cold Spring. Harb. Perspect. Biol. 2012. V. 4. P. a003582.
- Cheng L.K., Unrau P.J. // Cold Spring. Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. P. a002204.
- Song K.M., Lee S., Ban C. // Sensors (Basel). 2012. V. 12. P. 612–631.
- Burnett J.C., Rossi J.J. // Chem. Biol. 2012. V. 19. P. 60–71.
- Conrad R.C., Giver L., Tian Y., Ellington A.D. // Meth. Enzymol. 1996. V. 267. P. 336–367.
- Kulbachinskiy A.V. // Biochemistry (Moscow). 2007. V. 72. P. 1505–1518.
- Bouchard P.R., Hutabarat R.M., Thompson K.M. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010. V. 50. P. 237–257.
- Cibieli A., Pestourie C., Ducongé F. // Biochimie. 2012. V. 94. P. 1595–1606.
- Yang L., Zhang X., Ye M., Jiang J., Yang R., Fu T., Chen Y., Wang K., Liu C., Tan W. // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011. V. 63. P. 1361–1370.
- Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
- Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
- Hermann T., Patel D.J. // Science. 2000. V. 287. P. 820–825.
- Nakamura Y., Ishiguro A., Miyakawa S. // Genes Cells. 2012. V. 17. P. 344–364.
- Marimuthu C., Tang T.H., Tominaga J., Tan S.C., Gopinath S.C. // Analyst. 2012. V. 137. P. 1307–1315.
- Mascini M., Palchetti I., Tombelli S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. V. 51. P. 1316–1332.
- Liu J., You M., Pu Y., Liu H., Ye M., Tan W. // Curr. Med. Chem. 2011. V. 18. P. 4117–4125.
- Feldheim D.L., Eaton B.E. // ACS Nano. 2007. V. 1. P. 154–159.
- Zaher H.S., Unrau P.J. // RNA. 2007. V. 13. P. 1017–1026.
- Yan X., Gao X., Zhang Z. // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2004. V. 2. P. 32–42.
- Kuwahara M., Sugimoto N. // Molecules. 2010. V. 15. P. 5423–5444.
- Li N., Nguyen H.H., Byrom M., Ellington A.D. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e20299.
- Derbyshire N., White S.J., Bunka D.H., Song L., Stead S., Tarbin J., Sharman M., Zhou D., Stockley P.G. // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 6595–6602.
- Lebars I., Richard T., Di Primo C., Toulmé J.J. // Blood Cells Mol. Dis. 2007. V. 38. P. 204–209.
- Hernandez F.J., Stockdale K.R., Huang L., Horswill A.R., Behlke M.A., McNamara J.O. 2nd. // Nucl. Acid Ther. 2012. V. 22. P. 58–68.
- Siddiqui M.A., Keating G.M. // Drugs. 2005. V. 65. P. 1571–1579.
- Mayer G. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009. V. 48. P. 2672–2689.
- Nitsche A., Kurth A., Dunkhorst A., Pänke O., Sielaff H., Junge W., Muth D., Scheller F., Stöcklein W., Dahmen C., et al. // BMC Biotechnol. 2007. V. 7. P. 48.
- Mori Y., Nakamura Y., Ohuchi S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 420. P. 440–443.
- Di Giusto D.A., Knox S.M., Lai Y., Tyrelle G.D., Aung M.T., King G.C. // ChemBioChem. 2006. V. 7. P. 535–544.
- Levin A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1489. P. 69–84.
- Eulberg D., Klussmann S. // ChemBioChem. 2003. V. 4. P. 979–983.
- Turner J.J., Hoos J.S., Vonhoff S., Klussmann S. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. e147.
- Hafner M., Vianini E., Albertoni B., Marchetti L., Grune I., Gloeckner C., Famulok M. // Nat. Protoc. 2008. V. 3. P. 579–587.
- Yamazaki S., Tan L., Mayer G., Hartig J.S., Song J.N., Reuter S., Restle T., Laufer S.D., Grohmann D., Krausslich H.G., et al. // Chem. Biol. 2007. V. 14. P. 804–812.
- Pasut G., Veronese F.M. // J. Control. Release. 2012. V. 161. P. 461–472.
- Milla P., Dosio F., Cattel L. // Curr. Drug Metab. 2012. V. 13. P. 105–119.
- Tan L., Neoh K.G., Kang E.T., Choe W.S., Su X. // Macromol. Biosci. 2011. V. 11. P. 1331–1335.
- Boomer R.M., Lewis S.D., Healy J.M., Kurz M., Wilson C., McCauley T.G. // Oligonucleotides. 2005. V. 15. P. 183–195.
- Rusconi C.P., Roberts J.D., Pitoc G.A., Nimjee S.M., White R.R., Quick G. Jr., Scardino E., Fay W.P., Sullenger B.A. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1423–1428.
- Rusconi C.P., Scardino E., Layzer J., Pitoc G.A., Ortel T.L., Monroe D., Sullenger B.A. // Nature. 2002. V. 419. P. 90–94.
- Bompiani K.M., Monroe D.M., Church F.C., Sullenger B.A. // J. Thromb. Haemost. 2012. V. 10. P. 870–880.
- Oney S., Lam R.T., Bompiani K.M., Blake C.M., Quick G., Heidel J.D., Liu J.Y., Mack B.C., Davis M.E., Leong K.W., et al. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 1224–1228.

44. Bompiani K.M., Woodruff R.S., Becker R.C., Nimjee S.M., Sullenger B.A. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012. V. 13. P. 1924–1934.
45. Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., Heidel J.D. // *Curr. Med. Chem.* 2004. V. 11. P. 179–197.
46. Mao H.Q., Leong K.W. // *Adv. Genet.* 2005. V. 53. P. 275–306.
47. Joachimi A., Mayer G., Hartig J.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 3036–3037.
48. Buff M.C., Schäfer F., Wulffen B., Müller J., Pöttsch B., Heckel A., Mayer G. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. 2111–2118.
49. Brieke C., Rohrbach F., Gottschalk A., Mayer G., Heckel A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51. P. 8446–8476.
50. Good P.D., Krikos A.J., Li S.X., Bertrand E., Lee N.S., Giver L., Ellington A., Zaia J.A., Rossi J.J., Engelke D.R. // *Gene Ther.* 1997. V. 4. P. 45–54.
51. Ausländer D., Wieland M., Ausländer S., Tigges M., Fussenegger M. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. e155.
52. Chaloin L., Lehmann M.J., Sczakiel G., Restle T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 4001–4008.
53. Mi J., Zhang X., Rabbani Z.N., Liu Y., Su Z., Vujaskovic Z., Kontos C.D., Sullenger B.A., Clary B.M. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 3577–3584.
54. Mayer G., Blind M., Nagel W., Böhm T., Knorr T., Jackson C.L., Kolanus W., Famulok M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 4961–4965.
55. Davydova A.S., Vorobjeva M.A., Venyaminova A.G. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. № 4(11). P. 12–29.
56. Meyer C., Eydeler K., Magbanua E., Zivkovic T., Piganeau N., Lorenzen I., Grötzinger J., Mayer G., Rose-John S., Hahn U. // *RNA Biol.* 2012. V. 9. P. 67–80.
57. Zhao Y., Duan S., Zeng X., Liu C., Davies N.M., Li B., Forrest M.L. // *Mol. Pharm.* 2012. V. 9. P. 1705–1716.
58. Min K., Jo H., Song K., Cho M., Chun Y.S., Jon S., Kim W.J., Ban C. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 2124–2132.
59. Liu Y., Kuan C.T., Mi J., Zhang X., Clary B.M., Bigner D.D., Sullenger B.A. // *Biol. Chem.* 2009. V. 390. P. 137–144.
60. Sun W., Du L., Li M. // *Curr. Pharm. Des.* 2011. V. 17. P. 80–91.
61. Ye M., Hu J., Peng M., Liu J., Liu J., Liu H., Zhao X., Tan W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 3341–3353.
62. Göringer H.U. // *Trends Parasitol.* 2012. V. 28. P. 106–113.
63. Moreno M., González V.M. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 5003–5010.
64. Wan Y., Liu Y., Allen P.B., Asghar W., Mahmood M.A., Tan J., Duhon H., Kim Y.T., Ellington A.D., Iqbal S.M. // *Lab. Chip.* 2012. V. 12. P. 4693–4701.
65. Sheng W., Chen T., Kamath R., Xiong X., Tan W., Fan Z.H. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 4199–4206.
66. Javier D.J., Nitin N., Levy M., Ellington A., Richards-Kortum R. // *Bioconjug. Chem.* 2008. V. 19. P. 1309–1312.
67. Khan S.A., Kanhanapally R., Fan Z., Beqa L., Singh A.K., Senapati D., Ray P.C. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2012. V. 48. P. 6711–6713.
68. Kanoatov M., Javaherian S., Krylov S.N. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 681. P. 92–97.
69. Javaherian S., Musheev M.U., Kanoatov M., Berezovski M.V., Krylov S.N. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. e62.
70. Han B., Zhao C., Yin J., Wang H. // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. V. 903. P. 112–117.
71. Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48. P. 1–13.
72. Mi J., Liu Y., Rabbani Z.N., Yang Z., Urban J.H., Sullenger B.A., Clary B.M. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. P. 22–24.
73. Gening L.V., Klincheva S.A., Reshetnjak A., Grollman A.P., Miller H. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2579–2586.
74. Lakhin A.V., Kazakov A.A., Makarova A.V., Pavlov Y.I., Efremova A.S., Shram S.I., Tarantul V.Z., Gening L.V. // *Nucl. Acid Ther.* 2012. V. 22. P. 49–57.
75. Cox J.C., Ellington A.D. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2525–2531.
76. Eulberg D., Buchner K., Maasch C., Klussmann S. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. e45.
77. Berezovski M., Drabovich A., Krylova S.M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 3165–3171.
78. Drabovich A.P., Berezovski M., Okhonin V., Krylov S.N. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 3171–3178.
79. Soontornworajit B., Wang Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 399. P. 1591–1599.
80. Hong P., Li W., Li J. // *Sensors (Basel).* 2012. V. 12. P. 1181–1193.
81. Shin S., Kim I.H., Kang W., Yang J.K., Hah S.S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 3322–3325.
82. Lee S., Song K.M., Jeon W., Jo H., Shim Y.B., Ban C. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 35. P. 291–296.
83. Wang Y., Xu D., Chen H.Y. // *Lab. Chip.* 2012. V. 12. P. 3184–3189.
84. Tan X., Chen W., Lu S., Zhu Z., Chen T., Zhu G., You M., Tan W. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 8272–8276.
85. Orozco J., Campuzano S., Kagan D., Zhou M., Gao W., Wang J. // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 7962–7969.
86. Kökpinar O., Walter J.G., Shoham Y., Stahl F., Scheper T. // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. P. 2371–2379.
87. Bruno J.G., Richarte A.M., Carrillo M.P., Edge A. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 31. P. 240–243.
88. Lauridsen L.H., Shamaileh H.A., Edwards S.L., Taran E., Veedu R.N. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e41702.
89. Huang Y., Zhao S., Chen Z.F., Shi M., Liang H. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2012. V. 48. P. 7480–7482.
90. Han K., Liang Z., Zhou N. // *Sensors.* 2010. V. 10. P. 4541–4557.
91. Ocaña C., Pacios M., del Valle M. // *Sensors (Basel).* 2012. V. 12. P. 3037–3048.
92. Feng L., Chen Y., Ren J., Qu X. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 2930–2937.
93. Missailidis S., Hardy A. // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2009. V. 19. P. 1073–1082.
94. Huang Y.Z., Hernandez F.J., Gu B., Stockdale K.R., Nanapaneni K., Scheetz T.E., Behlke M.A., Peek A.S., Bair T., Giangrande P.H., et al. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 82. P. 623–635.
95. Pastor F., Kolonias D., McNamara J.O. 2nd, Gilboa E. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. P. 1878–1886.
96. Zeller S.J., Kumar P. // *Yale J. Biol. Med.* 2011. V. 84. P. 301–309.
97. Binning J.M., Leung D.W., Amarasinghe G.K. // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. P. 29.
98. Gopinath S.C., Hayashi K., Kumar P.K. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 6732–6744.
99. Mufhandu H.T., Gray E.S., Madiga M.C., Tumba N., Alexandre K.B., Khoza T., Wibmer C.K., Moore P.L., Morris L., Khati M. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 4989–4999.
100. Zhang Y., Hong H., Cai W. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 4185–4194.
101. Orava E.W., Cicmil N., Gariépy J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1798. P. 2190–2200.
102. Zhu Q., Shibata T., Kabashima T., Kai M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 56. P. 396–399.
103. Neff C.P., Zhou J., Remling L., Kuruvilla J., Zhang J., Li H., Smith D.D., Swiderski P., Rossi J.J., Akkina R. // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. P. 66ra6.



104. Yu B., Tai H.C., Xue W., Lee L.J., Lee R.J. // *Mol. Membr. Biol.* 2010. V. 27. P. 286–298.
105. Talekar M., Kendall J., Denny W., Garg S. // *Anticancer Drugs*. 2011. V. 22. P. 949–962.
106. Aravind A., Jeyamohan P., Nair R., Veerananarayanan S., Nagaoka Y., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. V. 109. P. 2920–2931.
107. Kang H., O'Donoghue M.B., Liu H., Tan W. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2010. V. 46. P. 249–251.
108. Chen C.H., Dellamaggiore K.R., Ouellette C.P., Sedano C.D., Lizadjohry M., Chernis G.A., Gonzales M., Baltasar F.E., Fan A.L., Myerowitz R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 15908–15913.
109. Dombi T., Kwok K.K., Sultan M.B. // *BMC Ophthalmol.* 2012. V. 12. P. 37.

УДК 577.152.277:578.832.1

## Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1)

Р. Шах Махмуд\*, О. Н. Ильинская

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

\*E-mail: raihan.shah@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2013

**РЕФЕРАТ** Отсутствие эффективных противовирусных препаратов затрудняет противодействие опасному РНК-содержащему вирусу гриппа типа А (H1N1). Установлено, что секретируемая рибонуклеаза бацилл (биназа) проявляет противовирусную активность как при одноциклового, так и при многоциклового репродукции вируса гриппа А в диапазоне нетоксичных для эпителиальных клеток концентраций и множественности инфекции 0.01–0.1. Обработка вируса биназой в концентрации 1 мкг/мл в течение 15–30 мин снижала в 3–10 раз количество фокусобразующих единиц вируса и подавляла развитие вирусиндуцированного цитопатического действия в клетках легких человека линии А549. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия фермента с вирусом. Положительный заряд биназы, как и гемагглютинина вируса, обуславливает их электростатическое связывание с отрицательно заряженной сиаловой кислотой на клеточной поверхности с последующим проникновением в клетку. После потери капсидной оболочки и выхода вирусной РНК из эндосомы возможно ее непосредственное каталитическое расщепление интернализированной биназой. Полученные данные подтверждают перспективы использования биназы в качестве противовирусного агента, эффективного в отношении пандемического вируса гриппа А (H1N1). Несомненный прогресс в данном направлении исследований связан с установлением детальных механизмов противовирусного действия биназы и разработкой наиболее эффективного способа ее практического применения.

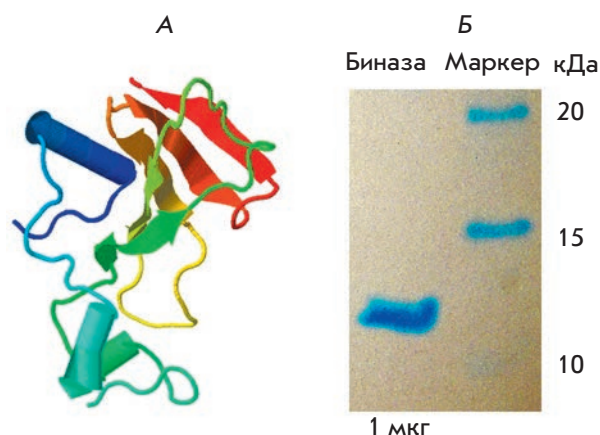
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антивирусная активность, вирус гриппа А (H1N1), рибонуклеаза *Bacillus intermedius*, цитотоксичность, эпителиальные клетки А549.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АЭК – 3-амино-9-этилкарбазол; ГАЕ – гемагглютинирующие единицы; МЖИ – множественность инфекции; ТФХК – L-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон; ФОЕ – фокусобразующие единицы.

### ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазы) в течение десятилетий привлекают внимание исследователей в качестве потенциальных терапевтических агентов. Ряд цитотоксических РНказ обладает селективным действием в отношении опухолевых клеток [1–3] и проявляет противовирусную активность [4, 5]. Такими свойствами обладают РНказы различного происхождения, среди которых наиболее хорошо изучены онконаза из ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens*, BS-РНказа из семенников быка и микробные РНказы из *Bacillus amyloliquefaciens* и *B. intermedius* (новое название этого вида – *B. pumilus* [6]) – барназа и биназа. Панкреатическая рибонуклеаза поджелудочной железы крупного рогатого скота, выпускаемая как коммерческий препарат «Рибонуклеаза аморфная», рекомендована для лечения синуситов и клещевого энцефалита. Однако внутриклеточ-

ный ингибитор РНказ, присутствующий в клетках человека, значительно снижает активность РНказ млекопитающих [7], ограничивая их использование в медицинской практике. Онконаза и BS-РНказа, в отличие от РНказы А и РНказы эозинофилов человека, способны подавлять репликацию вируса иммунодефицита человека типа 1 в клетках лейкоза Н9 без токсического воздействия на инфицированные клетки [4]. Биназа проявляет значительный защитный эффект (40–67%) при введении внутримышечно в место заражения уличным вирусом бешенства мышей, морских свинок, кроликов и не супрессирует развитие вакцинального антирабического иммунитета [5, 8]. Важно, что биназа не индуцирует синтез специфических маркеров иммунного ответа – антигена CD69 и  $\gamma$ -интерферона в популяции CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, что свидетельствует об отсутствии у фермента свойств индуктора поликлонального



**Рис. 1.** Трехмерная структура РНКазы *Bacillus pumilus*, полученная с использованием программы Jmol ([www.jmol.org](http://www.jmol.org); binase PDB id: 1buj) (А); электрофореграмма, подтверждающая чистоту использованного препарата биназы (Б)

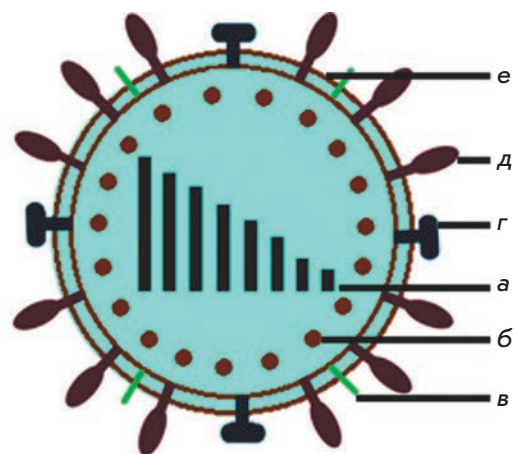
Т-клеточного ответа по типу суперантигена [9]. Ранее было показано, что на куриных эмбрионах, зараженных вирусами гриппа типа А (А/PR/8/34, А/Одесса/2882/82) и типа В (В/Ленинград/369/76), биназа на два порядка снижала инфекционный титр вирусов, что сопоставимо с активностью ремантадина против вируса гриппа А [10].

В связи с широкой вариабельностью и повсеместным распространением вирусов, поиск действенных противовирусных препаратов остается актуальной задачей. Цель настоящей работы состояла в изучении эффектов биназы в отношении вируса пандемического гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1), возбудителя эпидемии 2009 года. Нами установлено, что кратковременная обработка вирусных частиц (15–30 мин) биназой в возрастающих концентрациях пропорционально снижает способность вируса инфицировать клетки аденокарциномы легкого А549 в 3–10 раз. Максимальным эффектом обладала биназа в концентрации 1 мкг/мл, не снижающей жизнеспособность эпителиальных клеток, что позволяет считать биназу перспективным противовирусным агентом.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальная РНКаза

Биназа – гуанилспецифичная РНКаза *B. pumilus* 7Р (молекулярная масса 12,2 кДа, 109 аминокислотных остатков, рI 9,5) – выделена в гомогенном виде из культуральной жидкости *Escherichia coli* BL21, несущей плазмиду рGEMGX1/ent/Bi, согласно проце-



**Рис. 2.** Схематическое изображение вируса гриппа А (H1N1). а – восемь молекул вирусной РНК, кодирующих белки PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, М (M1, M2), NS (NS1, NS2); б – структурный белок М1; в – интегральный белок ионного канала в мембране вируса М2; г – нейраминидаза; д – гемагглютинин; е – липидный бислой вируса

дуре, описанной Шульгой и соавт. [11]. Молекулярная структура биназы известна (рис. 1А), чистота препарата подтверждена нами экспериментально (рис. 1Б). Каталитическая активность биназы по отношению к синтетическим субстратам и высокополимерной дрожжевой РНК охарактеризована ранее [12, 13].

### Культуры клеток

Клетки эпителия аденокарциномы легкого А549 и почки собаки спаниеля MDCK II (коллекция Института медицинской вирусологии Университета им. Юстуса Либига, Гиссен, Германия) выращивали на среде DMEM с добавлением пенициллина (100 ед./мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

### Штамм вируса гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1)

Штамм вируса гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1) получен из коллекции Института вирусологии Университета Гиссена в виде вирусосодержащей суспензии. Материал вируса хранили при температуре -80°C. Схематическое изображение вируса и его основных компонентов представлено на рис. 2.

### Жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток в присутствии биназы определяли по активности митохондриальных дегидрогеназ, превращающих неокрашенное производное тетразолийбромида 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий (МТТ) (Sigma, Германия) в фиолетовые кристаллы формазана [14]. Интенсив-



ность окраски в тесте спустя 24 и 48 ч инкубации клеток с биназой в концентрации 0.01–1000 мкг/мл определяли спектрофотометрически при длине волны 590 нм после растворения кристаллов формазана в диметилсульфоксиде.

### Рибонуклеазная активность

Рибонуклеазную активность в среде культивирования клеток A549 определяли по количеству кислото-растворимых продуктов гидролиза высокополимерной дрожжевой мРНК [15]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности на одну оптическую единицу при 260 нм в пересчете на 1 мл раствора фермента за 1 ч инкубации при 37°C.

### Количество вирусных частиц

Количество вирусных частиц в исходной суспензии фага определяли с помощью стандартного теста на гемагглютинацию с использованием 1.5% взвеси куриных эритроцитов [16, 17]. Количество вирусных частиц выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) на 1 мл, отражающих максимальную кратность разведения вирусосодержащей суспензии, вызывающей гемагглютинацию эритроцитов.

### Инфекционный титр вируса

Инфекционный титр вируса определяли иммуногистохимически по количеству фокусобразующих единиц (ФОЕ) [18]. Для этого вирусную суспензию добавляли к монослою клеток MDCK II. Инфицирование проводили в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего удаляли вирусную суспензию. Затем клетки выращивали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в поддерживающей среде DMEM-Avicel с добавлением 1.25% микрокристаллической целлюлозы (FMC, Бельгия), 0.36% бычьего сывороточного альбумина и трипсина, обработанного ингибитором химотрипсина ТФХК (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Спустя 28 ч культуральную жидкость сливали, а клетки фиксировали в течение 90 мин ледяным Тритоном X-100, обрабатывали мышинными антителами к белку NP вируса гриппа, а затем вторичными антимышиными антителами, мечеными пероксидазой хрена (ПХ) (Santa Cruz Biotechnology, США), окрашивали раствором АЭК (Sigma, США) в диметилформамиде, сканировали плашку и подсчитывали количество ФОЕ. Инфекционный титр выражали в ФОЕ на 1 мл вирусосодержащей суспензии.

### Репродукция вирусов

Репродукцию вирусов оценивали на монослое суточной культуры A549 (3 × 10<sup>4</sup> клеток в лунке) при заражении вирусом в соотношении 1 и 10 вирусных

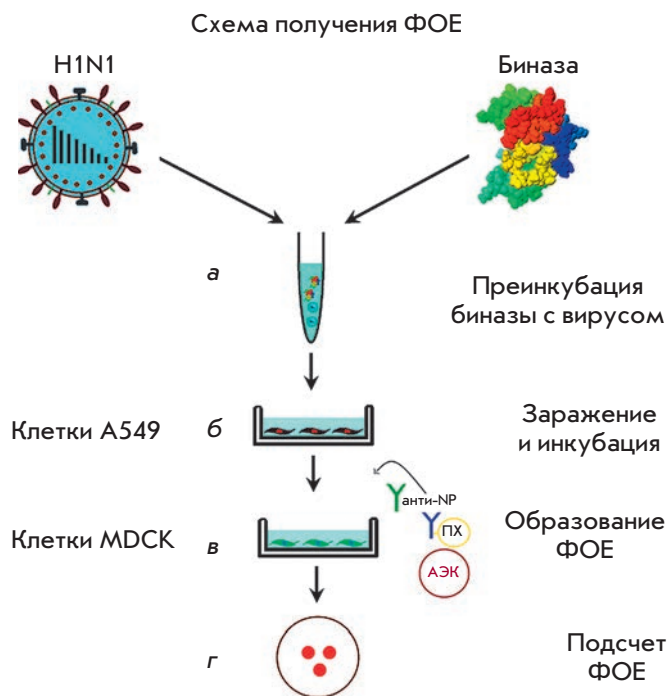


Рис. 3. Схема постановки реакции образования ФОЕ. а – преинкубация вирусов с биназой (15–60 мин); б – заражение клеток A549 вирусом, обработанным биназой, с последующим культивированием клеток в течение 12–24 ч; в – анализ содержания вирусов в культуральной жидкости клеток A549 по показателю образования ФОЕ в культуре клеток MDCK, культивируемых 28 ч с последующим добавлением первичных NP-антител к вирусу и вторичных антимышиных антител, меченных пероксидазой хрена; г – прямой подсчет ФОЕ

частиц на 100 клеток (множественность инфекции (МЖИ) 0.01 и 0.1 соответственно). Для анализа влияния биназы на инфицирующую способность вируса РНКазу преинкубировали с вирусом в течение 15–60 мин и затем заражали клетки A549. Для адсорбции вируса клетки выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Неадсорбированный вирус удаляли, инфицированные клетки инкубировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде DMEM с добавлением 0.36% бычьего сывороточного альбумина и ТФХК-трипсина (1 мкг/мл). Через 12 ч (одноцикловая репродукция вируса) и 24 ч (многоцикловая репродукция) отбирали супернатант, в котором определяли ФОЕ. Оставшиеся в лунках клетки промывали фосфатным буфером и окрашивали 1.25% раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 (Merck, Германия) для визуализации выживших после инфекции клеток. Схема эксперимента представлена на рис. 3.

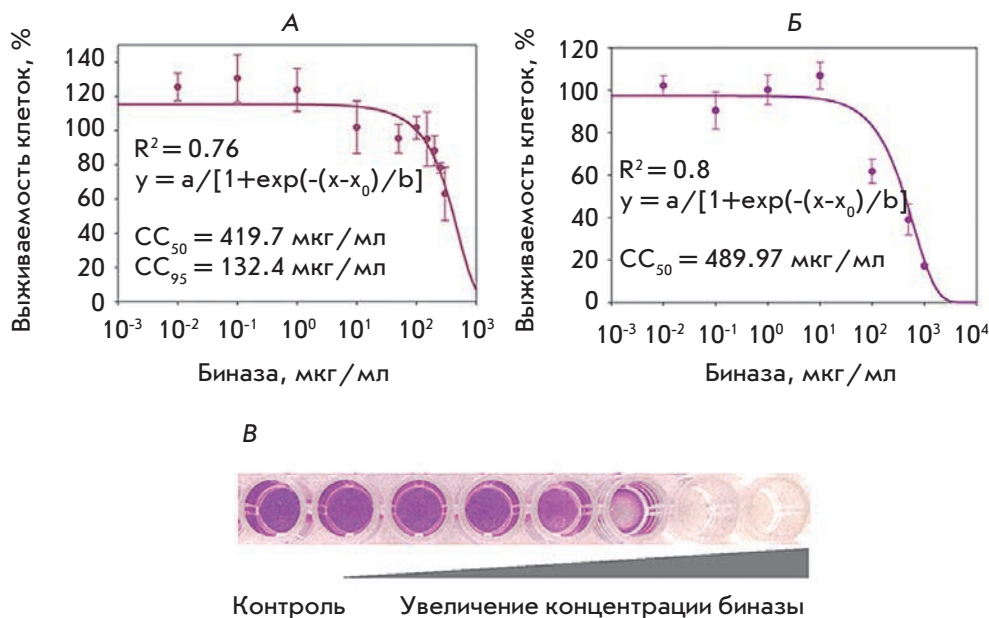


Рис. 4. Выживаемость клеток А549 при различных концентрациях биназы в течение 24 (А) и 48 ч (Б). Представлены величины статистической значимости аппроксимации, рассчитанные в программе SigmaPlot 10.  $CC_{50}$  и  $CC_{95}$  – концентрация биназы, вызывающая гибель 50 и 5% клеток соответственно. В – визуализация гибели клеток А549 при возрастающих концентрациях биназы (МТТ-тест)

### Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов, полученных из четырехкратных повторностей каждого эксперимента, проводили стандартными методами в программах Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Цитотоксичность биназы в отношении клеток аденокарциномы А549

Выявлено зависимое от концентрации биназы и времени ее воздействия угнетение жизнеспособности клеток линии А549 аденокарциномы легкого человека вплоть до их полной гибели при концентрации фермента, приближающейся к 1 мг/мл среды (соответствует 82 мкМ). Цитотоксическая концентрация биназы, вызывающая гибель 50% клеток ( $CC_{50}$ ), составила 420–490 мкг/мл при одно- и двухсуточной экспозиции соответственно (рис. 4А,Б). Для индукции гибели 5% клеток за 24 ч необходимо присутствие в среде биназы в концентрации 133 мкг/мл ( $CC_{95}$ ) (рис. 4А). При обработке биназой в течение 48 ч эта величина была значительно меньше, 15 мкг/мл (данные не представлены). Таким образом, концентрации биназы, нетоксичные для клеток, культивируемых в течение 1 сут, находятся в диапазоне до 133 мкг/мл. Эти данные согласуются с результатами оценки цитотоксичности биназы в отношении клеток линии А549, полученными ранее с использованием теста WST и цитометрии [19]. Поскольку цитотоксическое действие биназы более выражено в случае малигнизированных клеток эпителия легких,

чем нормальных [20], можно считать, что даже увеличение концентрации РНКазы на порядок не будет оказывать негативного влияния на жизнеспособность нормальных эпителиальных клеток.

Большинство РНКаз, участвующих в защите клеток от вирусной инфекции, синтезируются самими клетками хозяина и направляют их на путь апоптотической гибели. У животных противовирусный иммунитет обеспечивают рибонуклеазы семейства РНКазы А [21, 22], в том числе РНКазы L, активация которой вызывает апоптоз в инфицированных клетках [23]. Рибонуклеазы эозинофилов снижают инфекционность вирусных частиц *in vitro*, проникая в вирусный капсид и разрушая геномную РНК вируса [24]. Изучение РНКаз, введенных извне, показало, что панкреатическая РНКазы проявляет противогриппозную активность на куриных эмбрионах, которые не содержат ингибитор рибонуклеаз млекопитающих, но не обладает такой активностью на мышцах [10]. Онконаза способна селективно разрушать РНК вируса иммунодефицита человека, не затрагивая РНК хозяйских клеток [25]. Однако аналогичная РНКазы лягушки *Rana catesbeiana* не только ингибировала репликацию вируса японского энцефалита, но и стимулировала апоптоз в вирусинфицированных клетках [26]. Нами установлено, что биназа в используемых концентрациях не приводит к гибели эпителиальных клеток, и, кроме того, представляет собой неиммуногенный белок, не вызывающий Т-клеточный ответ по типу суперантигена [9], что значительно улучшает перспективы практического использования этой РНКазы.

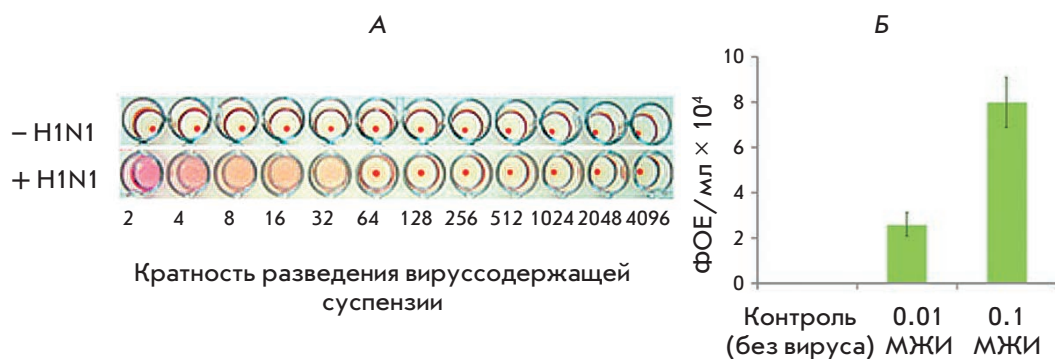


Рис. 5. Анализ вирусосодержащего материала на наличие вирусных частиц по образованию ГАЕ, рассчитанными как кратность разведения (А), и ФОЕ после 24 ч культивирования клеток А549 при разной МЖИ (Б)

**Снижение инфекционного титра вируса гриппа А (H1N1) под действием биназы**

Проведенный тест на гемагглютинацию показал, что в исходном вирусосодержащем материале гемагглютининовый титр вируса А/Hamburg/04/09 составил 32 ГАЕ/мл (рис. 5А), что свидетельствует о достаточном содержании вирусных частиц в суспензии и позволяет анализировать его устойчивость к противовирусным агентам. Заражение клеток А549 вирусом при МЖИ 0.01 и 0.1 показало, что вирус обладает высокой инфицирующей способностью, при этом с увеличением множественности инфекции увеличивалось и количество ФОЕ в лунках планшета (рис. 5Б). Расчетная величина инфекционного титра вирусосодержащего материала составила  $5.8 \times 10^6$  ФОЕ/мл.

С целью определения противовирусного эффекта биназы вирус преинкубировали в течение 30 и 60 мин с ферментом в концентрации ниже выявленной цитотоксической, а именно  $10^{-4}$ – $10^1$  мкг/мл. Затем этой суспензией заражали клетки А549, устанавливая степень их инфицированности при 0.1 МЖИ.

При одноциклового репликации вируса, когда зараженные клетки растили в течение 12 ч, титр

вируса снижался пропорционально увеличению концентрации биназы (рис. 6). При обработке в течение 30 мин биназой в концентрации 1 мкг/мл репродукция вируса снижалась в 3 раза (рис. 6А). При многоциклового репликации, продолжавшейся 24 ч, противовирусный эффект биназы был выше: зарегистрировано снижение репродукции вируса в 6 раз после обработки биназой в концентрации 10 мкг/мл в течение 60 мин (рис. 7Б). Как при одноциклового, так и при многоциклового репликации клетки А549 погибали от цитопатического действия вируса (рис. 6В, 7В, лунки без биназы). Однако количество клеток, оставшихся в монослое, увеличивалось при повышении концентраций биназы, использованных для обработки вируса. Максимальное подавление репродукции вируса (до 10 раз) наблюдалось через 1 сут после заражения клеток вирусом, преинкубированным в течение 30 мин с биназой в концентрации 1 мкг/мл (рис. 7А).

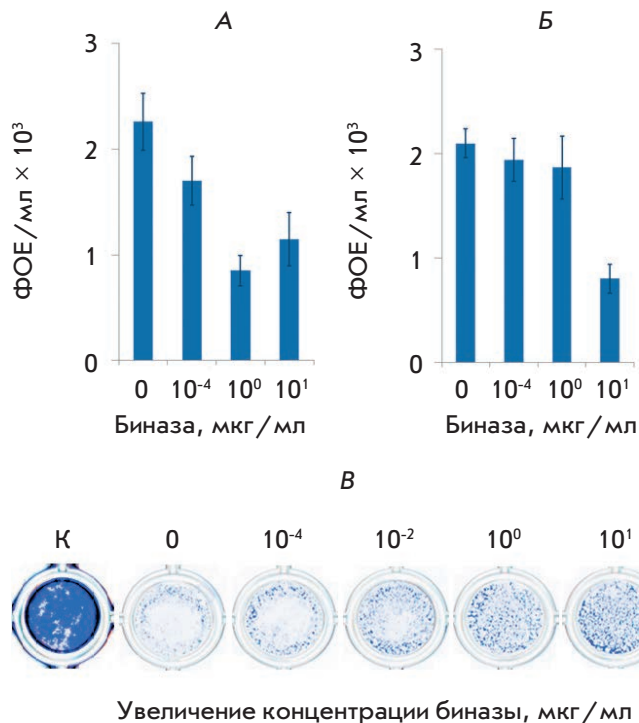
Поскольку биназа была наиболее эффективной при многоциклового репликации вируса, в дальнейшем мы оценивали противовирусное действие биназы через 1 сут после заражения, варьируя время преинкубации вируса с ферментом от 15 до 60 мин

Таблица 1. Снижение инфекционного титра вируса по сравнению с титром в исходной суспензии при многоциклового инфекции под действием биназы в зависимости от уровня инфицированности клеток вирусом и времени его преинкубации с ферментом

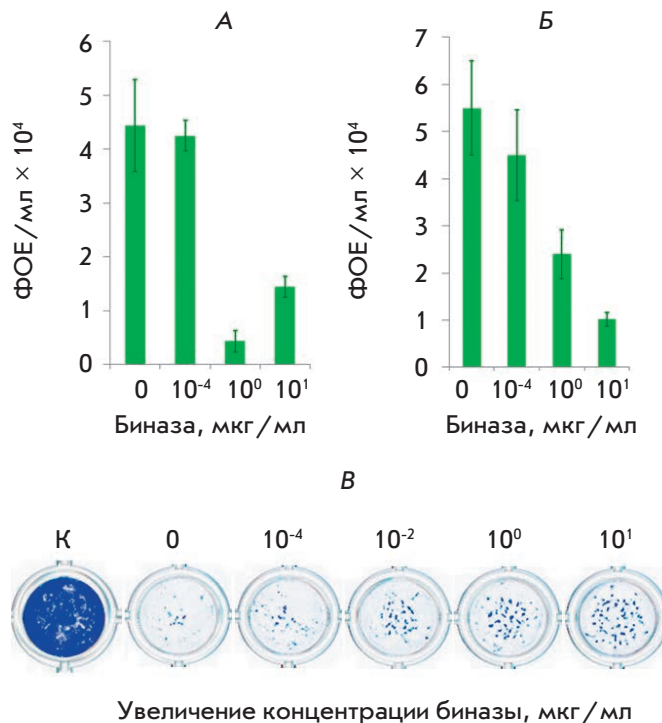
Биназа, мкг/мл	Преинкубация вируса с биназой, мин					
	15	30	60	15	30	60
	0.1 МЖИ			0.01 МЖИ		
0	100 ± 25.3	100 ± 19.2	100 ± 18.1	100 ± 21.0	100 ± 7.4	100 ± 35.4
1	17.5 ± 9.0*	9.7 ± 4.5*	43.6 ± 9.4*	36.4 ± 9.8*	27.5 ± 3.5*	93.8 ± 36.9

\*Статистически значимые отличия от контроля без обработки вируса биназой. За 100% принят титр вируса в исходном материале, не обработанном биназой.





**Рис. 6.** Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 30 (А) и 60 мин (Б); повышение выживаемости клеток А549, зараженных вирусом после обработки биназой в различной концентрации и культивируемых в течение 12 ч. Визуализация клеток А549 красителем Кумасии бриллиантовый синий (В)



**Рис. 7.** Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 30 (А) и 60 мин (Б); повышение выживаемости клеток А549, зараженных вирусом после обработки биназой в различной концентрации и культивируемых в течение 24 ч. Визуализация клеток А549 с красителем Кумасии бриллиантовый синий (В)

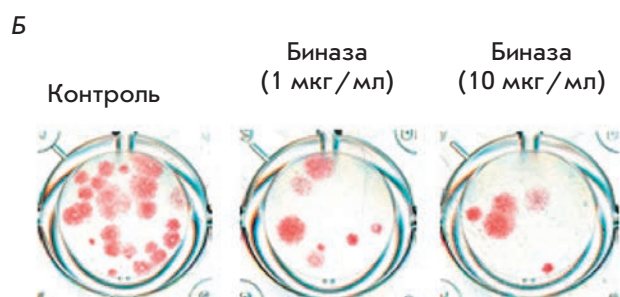
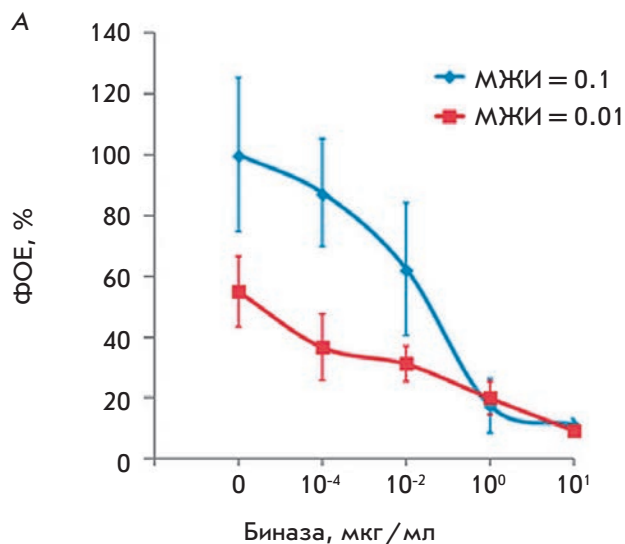
при двух различающихся на порядок уровнях заражения клеток А549 (0.1 и 0.01 МЖИ) (рис. 8А, табл. 1). Установлено, что противовирусный эффект биназы зависит как от времени преинкубации с вирусом, так и от степени заражения клеток вирусом. Высокий уровень инфекции (0.1 МЖИ) обеспечивает, по-видимому, большую возможность контакта вируса с молекулами биназы, вследствие чего эффект биназы более выражен, чем при низком уровне инфицированности клеток (0.01 МЖИ) (табл. 1).

При любом уровне инфицирования клеток наибольший противовирусный эффект наблюдали после преинкубации биназы с вирусом в течение 30 мин, более длительная преинкубация (60 мин) в 3 раза снижала противовирусный эффект (табл. 1). Поскольку противовирусная активность биназы при низком (0.01 МЖИ) уровне заражения клеток вирусом и обработке ферментом в течение 15 и 30 мин отличалась незначительно, краткосрочную инкубацию вируса с РНКазой (15 мин) можно рассматривать как достаточную для проявления оптимальной

противовирусной активности. Биназа в концентрации 1 мкг/мл за время предобработки (15 мин) приводит к снижению числа вирусных частиц в клетках примерно в 6 раз при 0.1 МЖИ и в 3 раза при 0.01 МЖИ (табл. 1). Увеличение концентрации РНКазы до 10 мкг/мл не приводило к дальнейшему снижению титра вируса, если обработку проводили в течение 30 мин (рис. 6А, 7А), но повышало противовирусную эффективность биназы при предобработке в течение 60 мин (рис. 6Б, 7Б).

Таким образом, нетоксичные для эпителиальных клеток А549 концентрации биназы (от 1 до 10 мкг/мл) ингибируют репродукцию вируса гриппа А (H1N1), предобработанного биназой в течение 15–30 мин.

Иммунофлуоресцентными методами показано, что уже в течение первых часов культивирования биназа проникает в клетки А549 [27]. Известно также, что в клетках миелоидных предшественников биназа сохраняет свою каталитическую активность в течение 48 ч [28]. Нами зарегистрировано снижение каталитической активности биназы в куль-



**Рис. 8.** Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 15 мин (А), и визуализация уменьшения числа ФОЕ на клетках MDCK (Б). За 100% принято значение ФОЕ/мл при 0.1 МЖИ без обработки биназой

туральной жидкости клеток А549, обработанных биназой в концентрации 1 и 10 мкг/мл (табл. 2), что также свидетельствует о проникновении фермента внутрь клетки. Механизм интернализации рибонуклеазы обусловлен взаимодействием катионного белка с отрицательным зарядом поверхности опухолевых клеток; дальнейшее проникновение РНКазы в клетку происходит путем эндоцитоза [1]. Поскольку вирус поглощается клеткой аналогичным путем, биназа может взаимодействовать с вирусом и внутри клетки, в частности в составе эндосом. Рецепторы гемагглютинаина вируса гриппа на поверхности клеток хозяина несут отрицательный заряд, обусловленный сиаловой кислотой [29, 30], следовательно, биназа способна электростатически взаимодействовать с поверхностью таких клеток независимо от вируса и проникать в них. В клетках, зараженных вирусом, биназа будет расщеплять вирусную РНК по крайней мере в течение 48 ч, пока

**Таблица 2.** Снижение каталитической активности биназы в культуральной жидкости клеток А549 (ед./мл) после 48 ч культивирования

Биназа, мкг/мл	0 ч	48 ч
0	5.3 ± 1.4	63.0 ± 9.3
1	7107.1 ± 770.7	4078.3 ± 462.7
10	64600.0 ± 6648.7	45000.0 ± 5870.0

сама не будет гидролизована клеточными протеазами [28]. Важно отметить, что высокая термостойкость биназы и сохранение ее активности в широком диапазоне рН [31] является одним из важных факторов, обуславливающих возможность использования данного фермента.

Показано, что биназа проявляет противовирусную активность в отношении вируса бешенства, ящера, ряда вирусов растений, а также сезонного гриппа [8, 10, 32]. От вируса гриппа в мире ежегодно умирают до 0.5 млн человек. По данным ВОЗ, только пандемическим гриппом, вызванным вирусом А (H1N1), на октябрь 2009 года заболели 414000 человек и умерли 5000 из них (www.who.int). Эффективность признанных в настоящее время защитных стратегий, включая вакцинацию, прием ингибиторов нейраминидазы, ограничена, поскольку вирус постоянно изменяется посредством антигенного дрейфа и смешения генетического материала вирусов. В связи с этим важно выработать новую терапевтическую стратегию, эффективность которой не зависит от подтипа вируса. Наши данные свидетельствуют о перспективности разработки противовирусной терапии на основе бактериальных РНКаз. Биназа, обладающая рядом преимуществ перед эукариотическими аналогами (нечувствительность к ингибитору РНКаз млекопитающих, простота получения), может стать противовирусным агентом нового поколения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Борьба с пандемиями вирусов гриппа типа А/Н1N1 является одной из актуальных задач современной науки в связи с масштабными убытками в социально-экономической сфере, связанными с заболеваемостью гриппом. Быстрое распространение вирусной инфекции может быть сдержано применением препаратов широкой специфичности, эффективных независимо от конкретных мутаций вирусного генома. Нами показано, что секретируемая рибонуклеаза *B. intermedius* (биназа) нетоксична для эпителиальных клеток человека в диапазоне концентраций,

проявляющих противовирусную активность. Предварительная обработка вирусных частиц биназой в концентрациях порядка 1 мкг/мл приводила к значительному снижению инфекционности вируса (до 10 раз) и подавляла развитие вирусиндуцированного цитопатического действия в линии клеток A549 легкого человека при различной множественности инфекций как при одноцикловой, так и при многоцикловой репродукции вируса. Тонкие механизмы противовирусного действия бациллярной РНКазы нуждаются в дальнейшем изучении, хотя можно считать, что они включают как заряд-зарядовое взаимодействие катионной биназы с отрицательно заряженными рецепторами гемагглютинаина на поверхности клеток хозяина, так и каталитическое расщепление вирусной РНК внутри клеток. Полученные данные подтверждают возможность применения биназы как эффективного в отношении пандемического гриппа А (H1N1) противовирусного агента. ●

*Авторы благодарят проф. С. Плешку из Университета им. Юстуса Либига (Гиссен, Германия) за возможность проведения ряда экспериментов в его лаборатории, а также сотрудников кафедры микробиологии КФУ В.И. Вершинину и В.В. Ульянову за плодотворную дискуссию.*

*Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-01226а), программой «Евгений Завойский» (ДААД совместно с Минобрнауки Республики Татарстан), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (государственный контракт № 16.740.11.0611), субсидией, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS Lett. 2003. V. 540. № 1–3. P. 15–20.
- Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // Bioessays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
- Ardelt W., Ardel B., Darzynkiewicz Z. // Eur. J. Pharmacol. 2009. V. 625. № 1–3. P. 181–189.
- Youle R.J., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Hamilton R.S., Newton D., D'Alessio G., Gravel M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 13. P. 6012–6016.
- Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Баландин Т.Г., Деев С.М., Лещинская И.Б. // Вопросы вирусологии. 2004. Т. 49. № 6. С. 38–41.
- Шарипова М.Р., Тойменцева А.А., Сабирова А.Р., Мухаметзянова А.Д., Ахметова А.И., Марданова А.М., Балабан Н.П. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 3. С. 424–426.
- Leland P.A., Raines R.T. // Chem. Biol. 2001. V. 8. № 5. P. 405–413.
- Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Деев С.М., Баландин Т.Г., Лещинская И.Б. // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51. № 5. С. 41–43.
- Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 361. № 4. P. 1000–1005.
- Шнейдер М.А., Штильбанс Е.Б., Куприянов-Ашин Э.Г., Поцелуева Л.А., Заиконникова И.В., Куриненко Б.М. // Антибиотики и химиотерапия. 1990. Т. 35. № 3. С. 27–33.
- Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. // Protein Eng. 1998. V. 11. № 9. P. 775–782.
- Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. // FEBS Lett. 1994. V. 354. № 3. P. 305–306.
- Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. // Mutat. Res. 1996. V. 354. № 2. P. 203–209.
- Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Page J., Carrol W.R. // J. Biol. Chem. 1954. V. 207. P. 201–210.
- Wegmann T.G., Smithies O. // Transfusion. 1966. V. 6. № 1. P. 67–73.
- Pleschka S., Stein M., Schoop R., Hudson J.B. // Virol. J. 2009. V. 6. № 197. (doi:10.1186/1743-422X-6-197)
- Payne A.F., Binduga-Gajewska I., Kauffman E.B., Kramer L.D. // J. Virol. Meth. 2006. V. 134. № 1–2. P. 183–189.
- Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 3. С. 72–76.
- Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Прайсснер К.Т., Ильинская О.Н. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2010. Т. 152. № 3. С. 143–148.
- Rosenberg H.F., Domachowske J.B. // J. Leukoc Biol. 2001. V. 70. № 5. P. 691–698.
- Rosenberg H.F., Domachowske J.B. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. V. 9. № 3. P. 135–140.
- Liang S.L., Quirk D., Zhou A. // IUBMB Life. 2006. V. 58. № 9. P. 508–514.
- Domachowske J.B., Dyer K.D., Adams A.G., Leto T.L., Rosenberg H.F. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 14. P. 3358–3363.
- Saxena S.K., Gravel M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Ardel W., Youle R.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 34. P. 20783–20788.
- Lee Y.H., Wei C.W., Wang J.J., Chiou C.T. // Antiviral Res. 2011. V. 89. № 3. P. 193–198.
- Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. // Toxicon. 2013. V. 69. P. 219–226.
- Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS J. 2010. V. 277. P. 186–196.
- Arinaminpathy N., Grenfell B. // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e15674. (doi: 10.1371/journal.pone.0015674)
- Kobayashi Y., Suzuki Y. // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. e40422. (doi: 10.1371/journal.pone.0040422)
- Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
- Алексеева И.И., Куриненко Б.М., Клейнер Г.И., Скуя А.Ж., Пензикова Г.А., Орешина М.Г. // Антибиотики. 1981. Т. 26. № 7. С. 527–532.



УДК 577.21;579.23"315

# Конкуренция внутри интронов: сплайсинг побеждает полиаденилирование

М. В. Тихонов, П. Г. Георгиев\*, О. Г. Максименко\*

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

\*E-mail: mog@genebiology.ru, georgiev\_p@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2013

**РЕФЕРАТ** Кэпирование, сплайсинг и полиаденилирование многих мРНК эукариот сопряжено с транскрипцией. Согласованность этих процессов обеспечивает правильное созревание РНК и создает разнообразие синтезируемых изоформ. Процессинг РНК представляет собой цепь событий, в которой окончание одного этапа связано с началом следующего. В этом контексте связь между сплайсингом и полиаденилированием считается важной для регуляции работы генов. Нами обнаружено, что скрытые сигналы полиаденилирования широко представлены в интронах *Drosophila melanogaster*. В результате анализа встречаемости генов, полностью расположенных в интронах других генов, установлено, что перекрывание в сигналах полиаденилирования встречается достаточно часто и затрагивает около 17% всех генов. Показано, что активность сигналов полиаденилирования, расположенных внутри интронов, подавлена: они функционируют, находясь в экзонах, но не в интронах. Как в транзитной репортерной системе, так и в модельных геномных локусах транскрипция не останавливается в интронах *in vivo*. При удалении 5'-сайта сплайсинга включается использование сигналов полиаденилирования в интронах. Согласно анализу транскриптома *Drosophila*, сигналы полиаденилирования внутри интронов используются очень редко, и, по всей видимости, данные события регулируются при помощи особых механизмов. Наши данные подтверждают, что транскрипционный аппарат игнорирует преждевременные сигналы полиаденилирования, расположенные в интроне.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** интрон, сигналы полиаденилирования, сплайсинг, терминация транскрипции, экзон.

## ВВЕДЕНИЕ

В ходе созревания эукариотические мРНК подвергаются кэпированию, сплайсингу и полиаденилированию. Молекулярные механизмы, ответственные за эти изменения, связаны как друг с другом, так и с транскрипционным аппаратом [1–5]. Эта взаимосвязь подтверждается наличием факторов сплайсинга и компонентов комплекса расщепления и полиаденилирования, привлекаемых *in vitro* на РНК-полимеразу II (РНКП II) до начала транскрипции, а затем переносимых на новосинтезированную РНК [6, 7]. В качестве примера такой взаимосвязи можно привести процесс определения последнего экзона. Показано, что распознавание 3'-сайта сплайсинга (3'СС) последнего интрона сильно повышает эффективность нижележащего сигнала полиаденилирования (СПА) [8–10], а фактор U2AF, ассоциированный с 3'СС, увеличивает эффективность СПА путем прямого молекулярного контакта с поли(А)-полимеразой [11]. Кроме того, белковые компоненты U2 snRNP (малый ядерный рибонуклеопротеин), связывающиеся с 3'СС и расположенной рядом точкой ветвления, помогают усилить 3'-концевой про-

цессинг через взаимодействие с CPSF (фактор, стимулирующий расщепление и полиаденилирование) [12]. Фактор U2AF65 стимулирует процессинг 3'-конца за счет взаимодействия аргинин/серин-богатого участка с RS-подобным доменом субъединицы 59 кДа фактора расщепления I (CF Im) [13]. Вероятно, после расщепления РНК происходит полиаденилирование ее 3'-конца, после этого сплайсингу подвергается последний интрон [14], а полиаденилирование запускает освобождение РНК от полимеразы только после завершения сплайсинга [15]. Еще один важный факт – взаимодействие U1 snRNP, необходимого для определения 5'-сайта сплайсинга, с фактором I расщепления и полиаденилирования млекопитающих [16]. Эти данные свидетельствуют о взаимосвязи процессов транскрипции генов и созревания мРНК.

СПА представляют собой простые последовательности, мотивы встречаются не только в 3'-нетранслируемых областях генов, но и в других участках генома, включая 5'-нетранслируемые области генов [17]. Преждевременное полиаденилирование может привести к нарушению функции гена и, следовательно, должно быть предотвращено. Обнаруже-

но, что в клетках *Drosophila* и человека СПА, расположенные вблизи точек начала транскрипции, не функционируют [17]. СПА найдены также выше 5'СС, а точечная мутация в донорном сайте сплайсинга активирует вышележащий скрытый СПА [18]. У вируса папилломы крупного рогатого скота использование позднего СПА на более ранних стадиях инфекции предотвращается расположенным вблизи 5'СС. Распознавание 5'СС комплексом U1 snRNP блокирует поли(А)-полимеразу путем прямого с ней взаимодействия через субъединицу U1 snRNP массой 70 кДа [19]. Недавнее полногеномное исследование эффекта нокдауна U1 snRNP в клетках HeLa выявило случаи преждевременного расщепления и полиаденилирования многочисленных пре-мРНК на скрытых СПА, особенно часто в интронах вблизи старта транскрипции [20]. На основе блокирования полиаденилирования комплексом U1 snRNP предложен метод выключения генов путем привлечения U1 snRNP на целевую РНК, что приводит к ингибированию добавления поли(А)-хвоста и, как следствие, к деградации РНК в ядре [21, 22]. Количественный анализ вариантов мРНК показал, что функционирование СПА внутри интронов может отличаться в разных клетках [23]. В качестве примера можно привести данные о том, что уровень U1 snRNP определяет длину транскрипта и возможность использования преждевременных СПА внутри интронов или дистальных СПА в 3'-некодирующей области [24]. Приведенные выше данные указывают на возможность существования конкуренции между сплайсингом и полиаденилированием внутри интронов.

В нашей работе мы сконцентрировались на связи между сплайсингом и полиаденилированием с участием СПА, расположенных в интронах. Наши результаты подтверждают широкое распространение этих сигналов внутри интронов и показывают, что функционирование СПА, расположенных внутри интронов, заблокировано как в транзientной репортерной системе, так и в геномных локусах *in vivo*. В то же время делеция 5'СС восстанавливает функцию СПА. Анализ полного транскриптома различных культур клеток и разных стадий развития *Drosophila* свидетельствует о переключении между синтезируемыми изоформами в случае транскриптов с альтернативным выбором 3'-экзонов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Предсказание СПА

Для предсказания сигналов полиаденилирования использовали программу PolyA\_SVM [25], подходящую, как показано ранее, для предсказания СПА у *Drosophila* [17]. Программа осуществляет поиск с помощью

скользящего окна с оценкой соответствия анализируемых последовательностей 15 *cis*-элементам, обнаруженным в известных СПА человека [25]. Последовательности всех аннотированных интронов *D. melanogaster* доступны в FlyBase [26]. Вероятность того, что элемент представляет собой СПА, характеризуется значением E-value (чем меньше значение, тем выше вероятность). Получаемые результаты делили на три категории: «сигнал присутствует», «сигнал отсутствует» и «интроны длиной менее 120 п.н.».

### Поиск генов, полностью расположенных в интроне другого гена

Аннотация генома *D. melanogaster* с координатами генов и интронов взята из FlyBase [26]. Если координата начала гена была больше координаты начала интрона, а координата конца – меньше, то ген обозначали как «вложенный» в интрон.

### Конструирование векторов репортерной системы

Векторы бицистронной репортерной системы созданы на основе вектора pAc5.1/V5-His B (Invitrogen). Гены люциферазы светлячка (*Firefly*, далее *Fluc*) и медузы (*Renilla*, далее *Rluc*) были взяты из векторов pGL3Basic и pRL-CMV (Promega) соответственно. Сайт внутренней инициации трансляции из гена *reaper* амплифицирован с геномной ДНК и клонирован перед *Fluc*. Терминатор SV40 взят из вектора pAc5.1/V5-His B. Интрон и терминатор гена *yellow* вырезаны из фрагмента ДНК длиной 8 т.п.н., любезно предоставленного P. Geys (Университет Айовы). СПА генов *nor5* и *eIF6* амплифицированы с геномной ДНК. При создании искусственного интрона (AI) использовали олигонуклеотиды с необходимыми сайтами. В качестве последовательности, разделяющей донорный и акцепторный сайты сплайсинга, использовали кодирующую часть гена *lacZ*.

### Культивирование клеток, трансфекция, выделение РНК, двойной люциферазный анализ

Культуру клеток *Drosophila* S2 выращивали на среде SFX (HyClone) при 25°C. Клетки трансфицировали с помощью реагента Cellfectin II (Invitrogen) по протоколу производителя. После трансфекции клетки выращивали в планшете в течение 24–48 ч.

РНК выделяли из трансфицированных клеток при помощи реагента TRI (Ambion) по протоколу производителя. Для разделения ядерной и цитоплазматической РНК клетки культуры S2 снимали с 100-мм чашек, промывали фосфатным буфером, осаждали и ресуспендировали в 100 мл буфера TD (0.8% NaCl, 0.028 M KCl, 0.01% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% Трис-HCl; pH 7.4–7.5). В полученную суспензию добавляли 100 мкл TD с 1% NP-40 и ингибитором ри-

бонуклеаз SUPERase-In (Ambion), выдерживали в течение 5 мин на льду. Препарат центрифугировали, из супернатанта выделяли цитоплазматическую РНК, используя реагент TRI. Осадок, содержащий ядра, ресуспендировали в 200 мкл TD с 0.5% NP-40 и SUPERase-In, инкубировали на льду и повторно центрифугировали. Ядерную фракцию выделяли из осадка, используя реагент TRI.

Двойной люциферазный анализ проводили, используя набор реактивов Firefly & Renilla Luciferase Assay Kit (Biotium) по протоколу производителя.

### Анализ РНК

РНК (5–20 мкг) для проведения нозерн-блот-анализа разделяли в 1% агарозном геле с формальдегидом и переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану (BrightStar-Plus, Ambion) на аппарате Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) с последующей пришивкой ультрафиолетовым светом. Для синтеза зонда участка ДНК амплифицировали и встраивали под контроль T7-промотора. Мембрану гибридизовали с синтезированными *in vitro* РНК-зондами (наборы реактивов MEGAshortscript и MAXIscript, Ambion) с включенным biotin-16-UTP (Roche) и детектировали, используя Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific).

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с продукта, получаемого при обратной транскрипции РНК-проб. РНК обрабатывали 2 ед. Turbo DNase I (Ambion) в течение 30 мин при 37°C для удаления примеси геномной ДНК. В реакции обратной транскрипции использовали фермент ArrayScript reverse transcriptase (Ambion), используя 5 мкг РНК-матрицы и смесь шестинуклеотидных праймеров. Количественный анализ проводили методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad). Как минимум, три независимых реакции проводили одновременно для каждой точки, для каждого из трех независимо полученных образцов РНК. Относительные количества РНК определяли по циклу перехода через пороговое значение.

### Анализ паттерна экспрессии изоформ на основе данных секвенирования РНК

Все процедуры проводили с помощью программ на языке Java. Была использована аннотация генома из FlyBase (версия 5.40) для поиска транскриптов, оканчивающихся в интроне. Отбирали транскрипты, у которых последний экзон начинался выше донорного сайта интрона, в котором они заканчивались. Гены, которые пересекались с другими генами, были исключены из рассмотрения. Далее анализировали гены, у которых было только два варианта транс-

криптов: первый подвергался сплайсингу, второй – расщеплению/полиаденилированию в интроне. SAM-файлы с данными секвенирования РНК 30 стадий развития и четырех линий клеток получены из базы modENCODE. Чтения (риды) были соотнесены со структурой гена. Среднее значение плотности чтения 3'-экзона использовали для оценки относительного уровня сплайсированной формы. Уровень изоформы, терминированной в интроне, вычислен как разность между средним значением для участка между 5'СС и концом транскрипта и средним значением участка между концом транскрипта и 3'СС (вероятно, соответствует несплайсированной РНК). Для визуализации паттерна экспрессии каждой изоформы и доли терминированной в интроне изоформы к общей РНК гена создана тепловая карта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

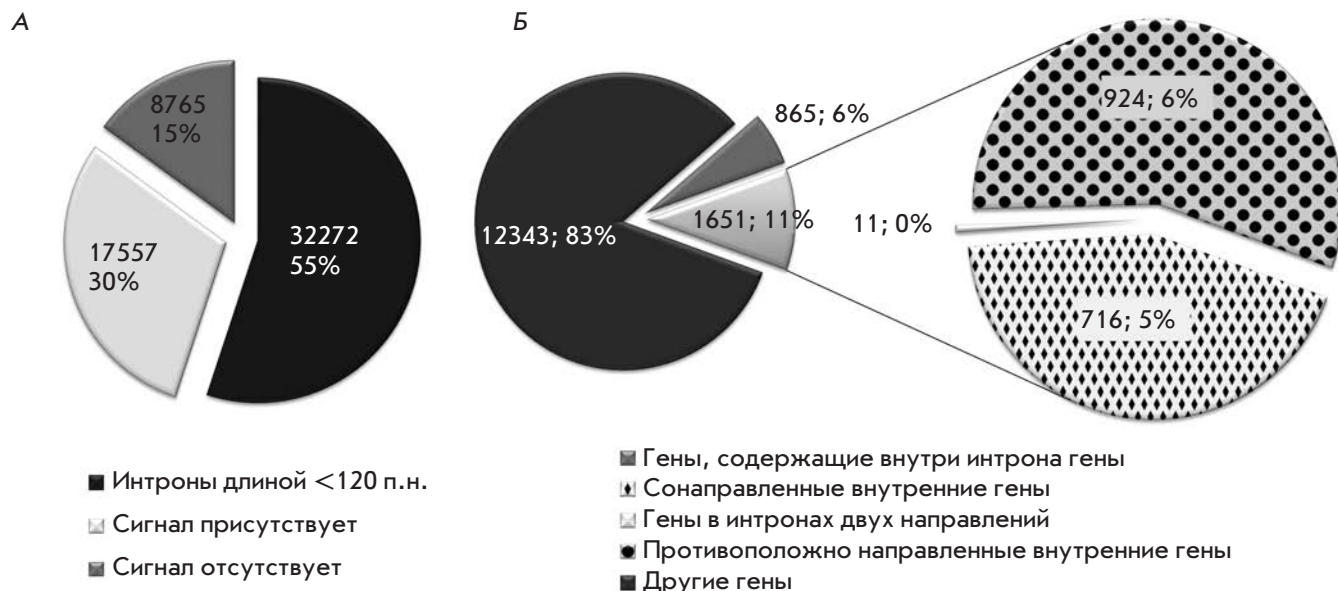
### СПА широко представлены в интронах *Drosophila*

Как отмечалось выше, по-видимому, СПА широко распространены в геноме, а их преждевременное использование может привести к нарушению функции генов. Следовательно, должны существовать механизмы, предотвращающие полиаденилирование в неподходящем месте. Ранее было показано блокирование СПА в 5'-нетранслируемой области генов [17]. Появлению неподходящих сигналов в кодирующей части препятствует давление отбора, интроны же, напротив, подвержены изменениям, что может привести к возникновению преждевременных СПА. Мы проверили, насколько широко такие сигналы представлены в интронах *Drosophila*. С этой целью использовали программу PolyA\_SVM, предназначенную для анализа и предсказания СПА [25]. Эта программа, как показано ранее, подходит для предсказания СПА у *Drosophila* [17].

Нуклеотидные последовательности 58 594 интронов *Drosophila* получены из FlyBase, версия 5.34 [26]. Приблизительно 55% этих последовательностей были короче 120 п.н., минимальной длины, необходимой для запуска программы (*рис. 1А*); две трети остальных (около 30% всей выборки) содержали один или более СПА. Таким образом, потенциальные СПА широко представлены в интронах. Существует два возможных состояния таких сигналов: они могут быть молчащими или активными. В первом случае сигнал никак не влияет на транскрипцию, проходящую через него, и последующий сплайсинг. Во втором варианте наблюдается преждевременная терминация транскрипции.

В этом контексте интересно изучить пары генов, в которых один «вложенный» ген полностью находится в интроне другого. В этом случае СПА внутреннего





**Рис. 1.** СПА широко представлены в интронах *Drosophila*. А – круговая диаграмма, отображающая доли интронов, содержащих и не содержащих СПА, и долю коротких интронов. Предсказано программой PolyA\_SVM. Б – круговая диаграмма, отображающая доли генов, содержащих другие гены внутри интрона, и доли генов, вложенных в интроны, разделенные на группы по их принадлежности тяжю ДНК

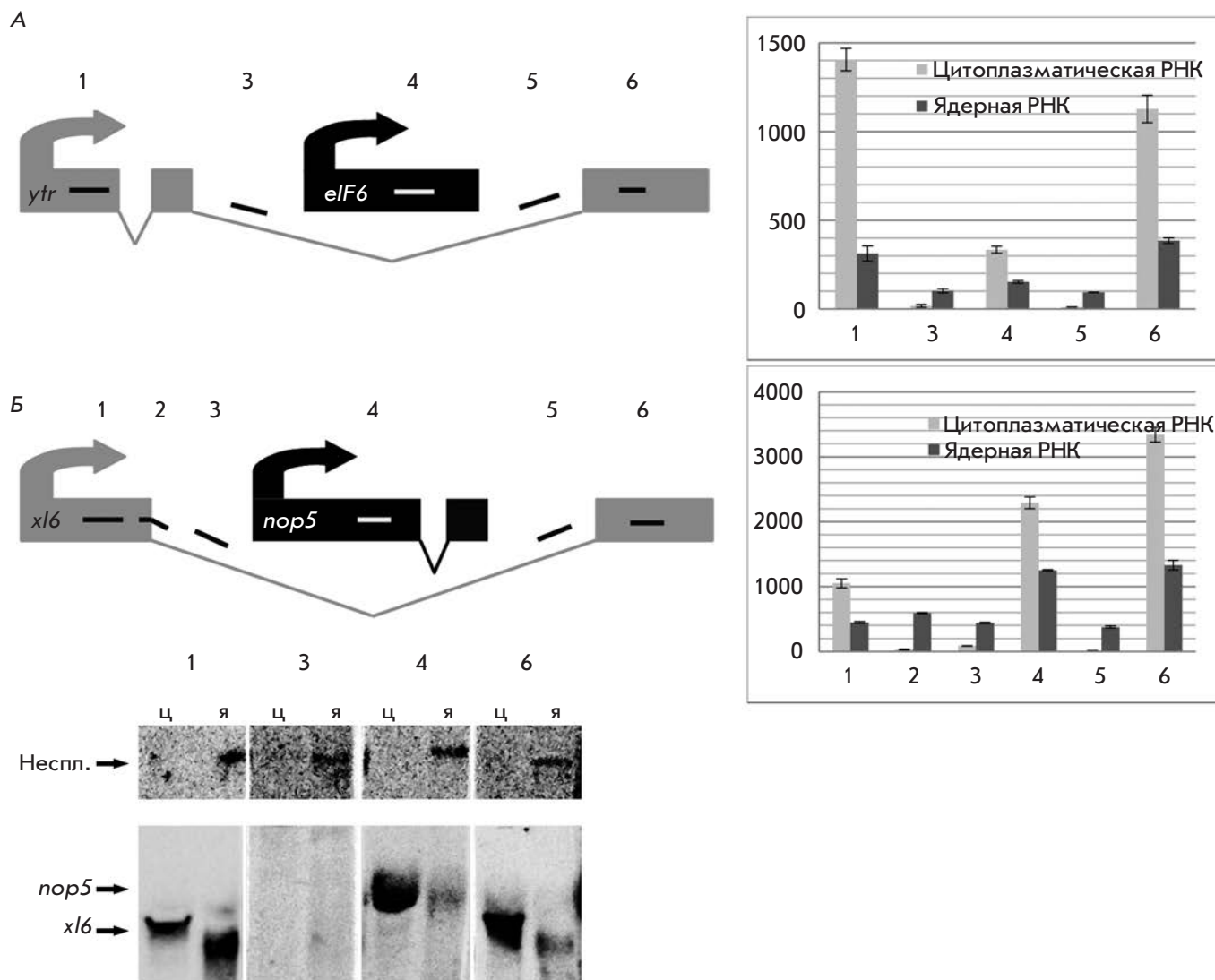
вложенного гена не должен влиять на транскрипцию внешнего. Главное отличие между транскриптами вложенного и внешнего генов в момент прохождения через СПА последнего состоит в том, что транскрипт внешнего гена имеет 5'СС. Мы проанализировали встречаемость таких пар генов, используя данные FlyBase [26] (рис. 1Б). Координаты генов и их интронов использовали для определения случаев, когда один ген полностью располагается внутри интрона другого. Найдено 865 внешних генов, содержащих 1651 вложенный ген. Из них 727 имели то же направление, что и внешний ген, поэтому их регуляторные элементы могут влиять на экспрессию внешнего гена. Таким образом, мы показали, что СПА широко представлены в последовательностях интронов, а возможность влияния СПА внутреннего гена на экспрессию внешнего – случай достаточно общий, затрагивающий около 17% генов.

**Экспериментальное подтверждение функционирования СПА в экзонах, но не в интронах**

Как показано выше, транскрипционная машина часто встречается с преждевременным СПА внутри интронов. Возможность функционирования этих последовательностей можно показать на паре генов – вложенного и внешнего. С целью проверки влияния СПА вложенного гена на транскрипцию внешнего мы про-

вели количественную ОТ-ПЦР для двух пар генов, *ytr-eIF6* и *xl6-nop5* (рис. 2). Основным критерием выбора этих генов был высокий уровень их экспрессии в культуре клеток S2. Профили экспрессии получены из базы данных modENCODE [27, 28]. Проводили анализ для ядерной и цитоплазматической РНК, используя зонды к участкам, отмеченным на рис. 2. В то время как цитоплазматическая фракция содержала полностью созревшую РНК, в состав ядерной фракции входили также интермедиаты процессинга и продукты распада. Это позволяло выявлять не полностью процессированные и не транспортированные в цитоплазму транскрипты.

С использованием количественной ОТ-ПЦР в цитоплазматической фракции выявлен высокий уровень только участков, соответствующих экзонам анализируемых генов (рис. 2; зонды 1, 4, 6), содержание участков, соответствующих интронам, было на фоновом уровне (рис. 2; зонды 3, 5). Однако в ядерной фракции детектировались интронные участки, что указывает на присутствие длинного несплайсированного транскрипта генов *ytr* (рис. 2А) или *xl6* (рис. 2Б). Отсутствие значительных различий в содержании участков интронов (точки 3 и 5) и последнего экзона (точка 6) свидетельствует о том, что внутри интрона не происходит преждевременного расщепления/полиаденилирования транскриптов генов *ytr* и *xl6*, и транскрипты *eIF6* или *nop5* процес-



**Рис. 2.** СПА функционируют в экзонах, но не в интронах. На схемах эксперимента с парами генов *ytr-elf6* (А) и *x16-por5* (Б) экзоны и интроны изображены как прямоугольники и уголки (V) соответственно; короткие нумерованные линии отмечают участки, узнаваемые зондами. Гистограммы показывают уровень ядерной и цитоплазматической РНК в этих участках. Представлены средние значения и стандартное отклонение ( $n = 3$ ). Результат нозерн-блот-анализа ядерной (я) и цитоплазматической (ц) фракций РНК из клеток S2, гибридизованных с зондами, узнающими участки из генов *x16-por5*, представлен внизу (зонды из участков 1, 3, 4, 6)

сируются с использованием собственных СПА, т.е. в каждом из транскриптов срабатывал свой собственный сигнал полиаденилирования.

Параллельно мы провели нозерн-блот-анализ пары генов *x16-por5*, используя зонды к участкам из экзонов и одного интрона (рис. 2Б). В ядерной фракции детектируется (на пределе чувствительности) длинная РНК, соответствующая несплайсированному продукту *x16*. В обеих фракциях зонды, специфичные к экзонам, давали сигналы, соответствующие процессированным транскриптам *x16* (зонды 1 и 6) и *por5* (зонд 4).

Нужно отметить, что нозерн-блот-анализ не выявил транскриптов, расщепляемых на СПА гена *por5*, расположенного в интроне транскрипта гена *x16*. Транскрипт гена *x16* расщепляется/полиаденилируется только с использованием собственного СПА, локализованного в последнем экзоне.

Суммируя результаты нозерн-блот-анализа и количественной ОТ-ПЦР, можно заключить, что при транскрипции внешнего гена расположенный в интроне СПА игнорируется транскрипционной машиной, в то время как при экспрессии гена, вложенного в интрон, этот

СПА успешно используется, поскольку в данном случае он представляет собой экзонный сигнал.

### СПА, встроенные в интрон, функционально неактивны

Анализ эндогенных событий расщепления/полиаденилирования характеризует функционирование генов на своем месте в геноме и не предоставляет достаточной свободы для внесения изменений в процесс. Поэтому мы решили использовать репортерную систему для анализа функционирования СПА на клеточной культуре S2 *Drosophila*. Бицистронная система содержит гены двух люцифераз: Rluc (*Renilla luciferase*) и Fluc (*Firefly luciferase*), под общим промотором гена актина 5С. Последовательность сайта внутренней инициации трансляции (IRES) из гена *reaper* [29] встроена перед геном *Fluc* (рис. 3).

Анализируемые последовательности встраивали перед IRES. Мы ожидали, что, если СПА функционирует, то будет продуцироваться короткая моноцистронная РНК с *Rluc*. И, напротив, если сигнал не работает или работает слабо, то длинный бицистронный продукт будет транскрибироваться до СПА SV40, расположенного после *Fluc*. Плазмидами с этими конструкциями трансфицировали клетки культуры S2 *Drosophila*. Анализ проводили спустя 24–48 ч после трансфекции. Отношение количества длинной бицистронной мРНК к общему количеству мРНК, синтезируемой с конструкции, оценивали, сравнивая интенсивность хемилюминесценции Fluc и Rluc.

В первом наборе конструкций, предназначенном для определения базового уровня расщепления/полиаденилирования на разных СПА, после первого цистрона были клонированы поздний СПА вируса SV40 (tSV40) и СПА генов *nor5* (tnor5), *eIF6* (teIF6), *yellow* (ty). Базовую конструкцию без вставок и конструкцию с линкерной последовательностью (без СПА) такой же длины, как и тестируемые СПА, использовали в качестве контроля. Все перечисленные выше СПА снижали соотношение активностей Fluc/Rluc, указывая на то, что транскрипт расщеплялся/полиаденилировался с использованием СПА, встроенного после первого цистрона (рис. 3А). Для базовой и ty-конструкций мы провели нозерн-блот-анализ с зондами, специфичными к генам *Rluc* и *Fluc*, и подтвердили, что СПА ty приводит к появлению короткого транскрипта, детектируемого зондом R (выявляется полоса размером 1.7 т.н. против 3.8 т.н. в базовой конструкции (рис. 3)).

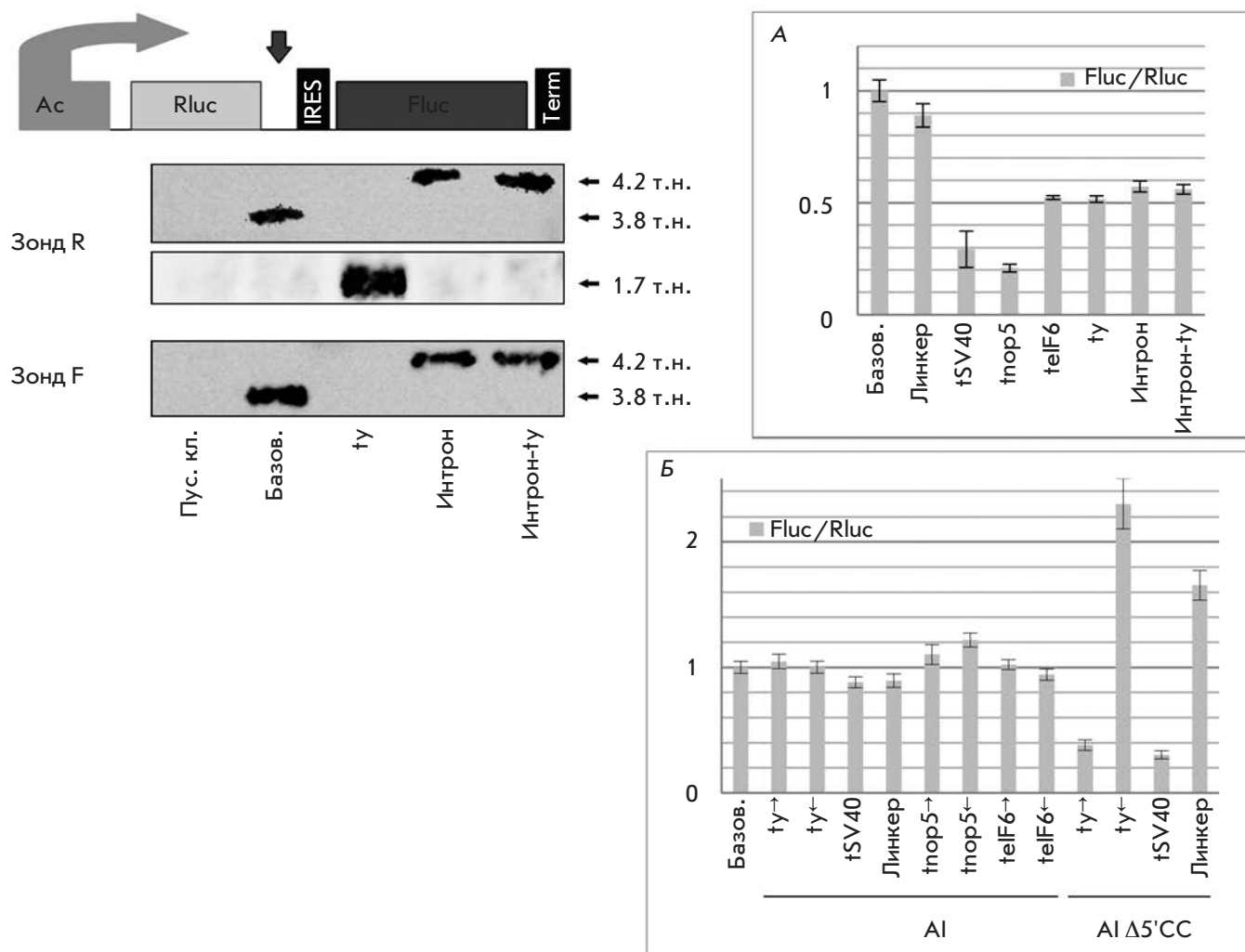
Второй набор конструкций был создан для определения активности СПА в интроне гена *yellow* *Drosophila*. Получены векторы с интроном и СПА ty, встроенным в интрон. Двойной люциферазный анализ показал, что вставка интрона снижает соотношение Fluc/Rluc по сравнению с базовой конструкцией

(рис. 3А). Мы объясняем это изменением эффективности IRES-зависимой инициации трансляции. Тем не менее вставка СПА ty в интрон не изменила отношения Fluc/Rluc по сравнению с отношением при использовании конструкции с интроном без вставки. Проведен нозерн-блот-анализ данных конструкций с зондами, специфичными к генам обеих люцифераз (рис. 3). Зонд F выявлял длинный транскрипт с двумя цистронами. Полосы гибридизации выявлены в дорожках, соответствующих базовой и двум интронсодержащим конструкциям. В случае интронсодержащих конструкций длина детектируемой РНК соответствовала сплайсированному варианту (4.2 т.н.). Зонд R выявлял все варианты РНК, синтезируемые с конструкций. В случае конструкции ty детектировалась только короткая форма (1.7 т.н.). В дорожках, соответствующих базовой и интронсодержащей конструкциям, зонд R обнаруживал такие же полосы, как и зонд F. Примечательно, что короткие формы транскриптов не обнаружены при анализе конструкций с СПА ty, встроенным в интрон.

Таким образом, мы показали, что транскрипт расщепляется/полиаденилируется во всех случаях, когда сигнал полиаденилирования находится в экзонах. СПА, расположенный в интроне гена *yellow*, не прерывал транскрипцию, и в этом случае детектировалась только сплайсированная форма.

Интрон гена *yellow* имеет большую длину, он может содержать неизвестные регуляторные элементы, потенциально способные влиять на транскрипцию. Поэтому мы решили создать искусственный интрон (AI), в котором нет каких-либо регуляторных элементов за исключением минимального набора сигналов сплайсинга: донорного и акцепторного сайтов, точки ветвления, поли(Т/С)-участка. Фрагмент кодирующей части гена *lacZ* был использован для разделения сигналов сплайсинга. Взяв за основу базовую бицистронную конструкцию, мы получили ее производные, содержащие разные СПА или линкерные последовательности внутри AI. С использованием этой системы проверили четыре СПА: ty, tSV40, tnor5 и teIF6 (рис. 3Б). В качестве контроля ty, tnor5 и teIF6 были клонированы также в обратной ориентации. В связи с тем, что СПА SV40 работает в обеих ориентациях, в качестве контроля взяли линкерную последовательность из гена *lacZ* такой же длины. В конструкциях, содержащих СПА в прямой ориентации, соотношение Fluc/Rluc не менялось значительно по сравнению с базовой конструкцией, конструкциями с СПА в обратной ориентации и конструкцией с линкером из *lacZ* (рис. 3Б). Таким образом, не обнаружено ни одного случая функционирования СПА в AI так же, как в модели с интроном гена *yellow* и в опытах с парами генов в геномном локусе.





**Рис. 3.** Репортерная система подтверждает, что СПА, вставленные в интрон, функционально заблокированы. Бицистронная система основана на двух люциферазах: Rluc и Fluc, гены которых расположены под общим промотором гена актина 5С. IRES располагается между генами двух люцифераз. Стрелка указывает место вставки СПА вируса SV40 (tSV40) и СПА из генов *por5* (tnop5), *eIF6* (telF6) и *yellow* (ty). Интрон гена *yellow* и этот же интрон с СПА ty встроены в это же положение. Отношение Fluc/Rluc в случае этих конструкций показано на гистограмме А. Результаты нозерн-блот-анализа нетрансфицированных (пус. кл.) и трансфицированных клеток S2 с пробами к обеим люциферазам подтверждают результаты люциферазного анализа. Гистограмма Б показывает соотношение Fluc/Rluc в случае конструкций с полным AI и с делетированным донорным сайтом (AI Δ5'CC). На гистограммах представлены средние значения и стандартное отклонение,  $n = 5$  (А) и 3 (Б)

Для подтверждения блокирования расщепления/полиаденилирования в интронах мы провели аналогичные опыты с конструкциями, содержащими ty и tSV40 внутри AI, но без донорного сайта. Как ожидалось, делеция донорного сайта должна превратить AI в продолжение экзона и активировать СПА. Как показано на рис. 3Б, отношение Fluc/Rluc, обеспечиваемое конструкциями, содержащими СПА, снижается. Следовательно, в отсутствие донорного сайта короткий моноцистронный транскрипт обра-

зуется с использованием первого встроенного СПА. Описана и обратная ситуация [30, 31], когда мутация приводит к появлению функционального 5'CC, а его распознавание компонентом сплайсосомы U1 snRNP вызывает подавление формирования 3'-конца мРНК.

**Использование СПА внутри интронов – редкое и, по всей видимости, индуцибельное явление**

Мы установили, что расщепление/полиаденилирование не происходит в пределах интро-

на – как при транскрипции геномных локусов, так и в плазмидной репортерной системе. Тем не менее известно, что если альтернативный 3'-экзон не включается в транскрипт, то транскрипция должна терминироваться в интроне (рис. 4А,Б). Используя аннотацию генома из FlyBase [26], мы проверили как часто транскрипт заканчивается в интроне другой изоформы и обнаружили 403 гена, организованных таким образом. Паттерн экспрессии этих изоформ мы анализировали с использованием данных секвенирования РНК для различных линий клеток и стадий развития, доступных в проекте modENCODE [27, 28]. Мы исключили 170 генов, которые перекрывались с другими генами, так как в подобной ситуации невозможно определить какой ген транскрибируется. Затем мы выбрали 70 генов, имеющих только два варианта транскриптов: первый подвергался сплайсингу, а второй заканчивался в интроне (рис. 4А). Долю транскрипта, оканчивающегося в интроне, оценивали как отношение его уровня к суммарному уровню обоих транскриптов.

Исходя из рассчитанных уровней транскриптов и их соотношения, мы разбили выбранные гены на несколько групп. Первая группа, наибольшая, включала 20 генов, у которых не детектировался транскрипт, оканчивающийся в интроне, или его уровень был близок к уровню «шума». Возможно, у генов этой категории транскрипты, расщепленные/полиаденилированные с использованием СПА в интроне, не образуются или образуются в очень маленьких количествах. Во второй группе, состоящей из шести генов, продукт сплайсинга не обнаружен, что ставит под сомнение наличие 3'-экзона. Третья группа, включающая 16 генов, характеризуется наличием обеих изоформ, причем переключение на синтез одной или другой является, по всей видимости, индуцируемым процессом (рис. 4В). Уровень экспрессии каждой изоформы и соотношение между ними изменяются в ходе развития или различаются в разных клеточных линиях. Кроме того, мы выделили группу генов с предположительно ошибочной аннотацией. Такое заключение основано на несоответствии границ экзонов и чтений при секвенировании РНК.

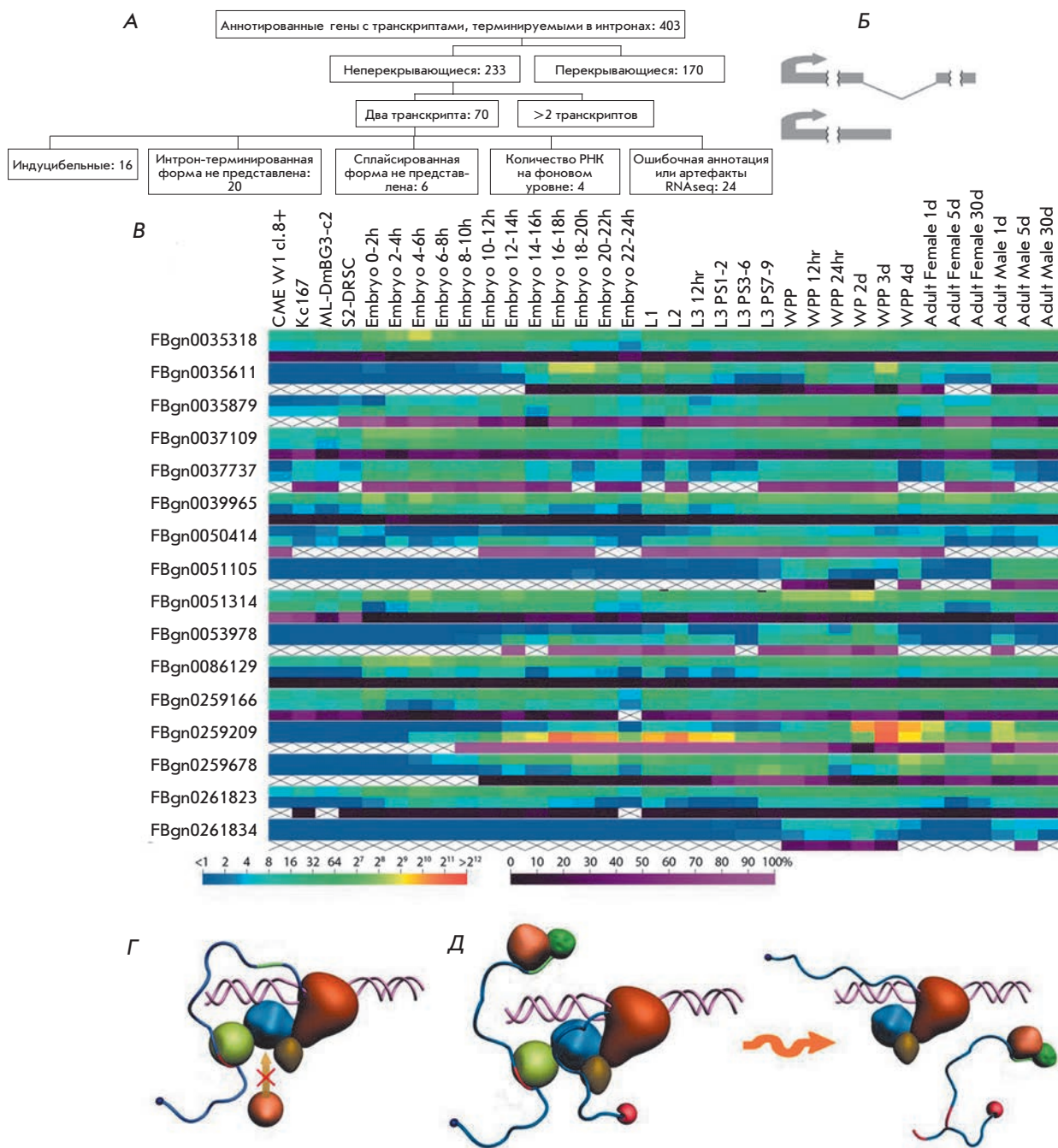
Таким образом, нами показано, что СПА, расположенные внутри интронов, используются в редких случаях. Согласно данным аннотации, только 403 гена имеют, возможно, транскрипты, оканчивающиеся в интроне. В действительности у 20 из 70 проанализированных генов транскрипт, оканчивающийся в интроне, не детектируется или его уровень близок к уровню «шума». Только у 16 генов обнаружили обе изоформы, уровень и соотношение которых менялись в ходе развития или отличались в разных линиях клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе мы исходили из предположения, согласно которому использование СПА внутри интронов не допускается. Ранее был описан феномен функционирования скрытых СПА внутри интрона при нокдауне U1 snRNP в клетках культуры HeLa [20]. Мы проверили частоту встречаемости СПА в интронах генов *Drosophila* и обнаружили, что мотивы СПА широко представлены в интронах (встречаются более чем в 30% интронов). Мы обратили внимание на те случаи, когда один ген расположен в интроне другого так, что при транскрипции последнего аппарат транскрипции проходит сквозь СПА внутреннего гена. Нами показано, что такая архитектура генов не приводит к перекрестному использованию СПА, т.е. транскрипция внешнего гена не ведет к использованию расположенного в его интроне СПА вложенного гена. Кроме того, мы не наблюдали образования транскриптов, процессируемых на интронных СПА, при экспрессии плазмидных репортерных систем как с интроном гена *yellow*, так и с искусственным интроном. Примечательно, что делеция донорного сайта сплайсинга в репортерной системе приводит к активации интронного СПА. Анализ полного транскриптома *Drosophila* показал, что изоформы, образующиеся при использовании СПА внутри интронов, редко экспрессируются, а соотношение таких и сплайсированных форм изменяется в ходе развития.

Суммируя наши и полученные ранее [19, 20] данные, можно сделать вывод, что транскрипция обычно не прерывается на СПА, расположенных внутри интронов. Исключения из этого правила редки и указывают на то, что для активации СПА внутри интронов необходимы дополнительные условия. Примечателен тот факт, что среди генов с альтернативным включением 3'-экзона мы обнаружили только 16 генов, образующих две изоформы транскриптов, – сплайсированную и процессируемую с использованием СПА внутри интрона. По нашему мнению, в данном случае происходит индуцированное переключение между изоформами.

Для объяснения данного феномена можно предложить две модели. Первая модель – модель «анти-терминации» – основана на данных о взаимодействии между факторами сплайсинга и комплексом расщепления/полиаденилирования [14, 19, 20]. Возможно, факторы сплайсинга и полиаденилирования конкурируют между собой и первые доминируют над вторыми (рис. 4Г). Это может происходить путем прямого белок-белкового взаимодействия, например, при конкурентном связывании факторов сплайсинга и полиаденилирования с С-концевым доменом РНКП II или при инактивации компонентов комплекса расщепления/полиаденилирования



**Рис. 4.** Использование СПА внутри интронов – событие редкое и, по всей видимости, индуцибельное. **А** – схема поиска генов с изоформой расщепляемой/полиаденилируемой в интроне. **Б** – схема отобранных генов с двумя транскриптами, где одна изоформа расщепляется/полиаденилируется в интроне другой. **В** – тепловая карта, иллюстрирующая паттерны экспрессии двух изоформ 16 генов в четырех линиях клеток и на 30 стадиях развития. Верхняя линия – уровень сплайсированной формы каждого гена, средняя – терминированной в интроне, нижняя – отношение уровня транскрипта, терминированного в интроне, к общей мРНК гена. Цветовая шкала внизу характеризует уровни экспрессии изоформ в величинах плотности прочтения при секвенировании РНК (слева) и долю терминированной в интроне изоформы (справа). **Г**–**Д** – две возможные модели. **Г** – в модели «антитерминации» СПА недоступен для комплекса расщепления/полиаденилирования из-за конкурентного связывания факторов сплайсинга и расщепления/полиаденилирования с элонгирующим комплексом. Сплайсинг побеждает полиаденилирование в связи с его более ранним вовлечением в процесс. **Д** – в «кинетической» модели СПА доступен, но движущаяся полимераза достигает 3'СС достаточно быстро, чтобы произошла реакция сплайсинга. Внесенные в транскрипт разрывы остаются в вырезаемом интермедиате и не приводят к терминированию транскрипции



факторами сплайсинга. Например, snRNP ингибирует поли(А)-полимеразу через прямое взаимодействие между U1 70K и поли(А)-полимеразой [19]. После того как U1 snRNP распознает донорный сайт, элонгационный комплекс РНКП II может стать недоступным для факторов расщепления/полиаденилирования. Сплайсинг побеждает полиаденилирование, так как компоненты сплайсосомы собираются в функциональный комплекс на более ранних этапах транскрипции. В то же время использование СПА внутри интрона может быть вызвано, в некоторых случаях, общими механизмами, используемыми при регуляции альтернативного сплайсинга, такими, как маскирование донорного сайта регуляторными белками или связыванием комплементарной РНК, изменением организации хроматина или, как описано в [24], уровнем U1 snRNP.

Вторая модель, «кинетическая», основана на предположении, что РНКП II продолжает свое движение после встречи с СПА [32, 33] и успешно достигает акцепторного сайта, вызывая прохождение реакции сплайсинга с образованием структуры «лассо» (рис. 4Д). В данном варианте расщепление и полиаденилирование могут происходить, но они не влияют на созревание мРНК, так как интермедиат «лассо» вырезается из транскрипта. Показано [34], что экзоны, окружающие интрон, созданный для котранскрипционного расщепления (CoTC), точно и эффективно сплайсируются вместе. Мы можем предположить, что СПА внутри интрона работает таким же образом. Эта модель предполагает, что переключение между использованием и пропуском СПА

в интроне может регулироваться не только маскированием донорного сайта, но и изменением скорости элонгации РНКП II, зависящей от метилирования CpG и организации хроматина. В общем случае РНКП II движется с высокой скоростью, достаточной для достижения акцепторного сайта, перед тем как быть вытесненной эндонуклеазами, которые привлекаются на РНК после расщепления с участием СПА внутри интрона. Если РНКП II остановится или замедлится ее движение, то транскрипция будет терминироваться, что в результате приведет к образованию короткой изоформы мРНК.

Другая возможная судьба продуктов, образующихся с использованием СПА внутри интрона, – деградация. Однако мы не выявили ни одного продукта, полученного с использованием СПА внутри интрона. Поэтому, если данное событие и возможно, то деградация должна происходить очень быстро или количество такой РНК мало. ●

*Мы благодарны Н.А. Горголюку за помощь в подготовке рукописи. Экспериментальная часть выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ИБГ РАН (ГК № 16.552.11.7067).*

*Работа поддержана программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, РФФИ (грант № 10.04.00341-а) (П.Г.), ФЦП «Кадры» № 8103 (П.Г.), стипендией Президента РФ СП-1960.2012.4 (О.М.), Министерством образования и науки РФ (П1165) (О.М.) и грантом ОПТЭК (О.М.).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Auboeuf D., Dowhan D.H., Dutertre M., Martin N., Berget S.M., O'Malley B.W. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 5307–5316.
- Bentley D.L. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. V. 17. P. 251–256.
- Calvo O., Manley J.L. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 1321–1327.
- Kornblihtt A.R., de la Mata M., Fededa J.P., Munoz M.J., Nogues G. // *RNA.* 2004. V. 10. P. 1489–1498.
- Maniatis T., Reed R. // *Nature.* 2002. V. 416. P. 499–506.
- Dantoni J.C., Murthy K.G., Manley J.L., Tora L. // *Nature.* 1997. V. 389. P. 399–402.
- Ujvári A., Luse D.S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 49773–49779.
- Niwa M., Rose S.D., Berget S.M. // *Genes Dev.* 1990. V. 4. P. 1552–1559.
- Niwa M., Berget S.M. // *Genes Dev.* 1991. V. 5. P. 2086–2095.
- Dye M.J., Proudfoot N.J. // *Mol. Cell.* 1999. V. 3. P. 371–378.
- Vagner S., Vagner C.C., Mattaj I.W. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 403–413.
- Kyburz A., Friedlein A., Langen H., Keller W. // *Mol. Cell.* 2006. V. 23. P. 195–205.
- Millevoi S., Loulergue C., Dettwiler S., Karaa S.Z., Keller W., Antoniou M., Vagner S. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 4854–4864.
- Rigo F., Martinson H.G. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. P. 849–862.
- Rigo F., Martinson H.G. // *RNA.* 2009. V. 15. P. 823–836.
- Awasthi S., Alwine J.C. // *RNA.* 2003. V. 9. P. 1400–1409.
- Guo J., Garrett M., Micklem G., Brogna S. // *Mol. Cell Biol.* 2011. V. 31. P. 639–651.
- Andersen P.K., Lykke-Andersen S., Jensen T.H. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2169–2179.
- Gunderson S.I., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj I.W. // *Mol. Cell.* 1998. V. 1. P. 255–264.
- Kaida D., Berg M.G., Younis I., Kasim M., Singh L.N., Wan L., Dreyfuss G. // *Nature.* 2010. V. 468. P. 664–668.
- Goraczniak R., Behlke M.A., Gunderson S.I. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 257–263.
- Abad X., Vera M., Jung S.P., Oswald E., Romero I., Amin V., Fortes P., Gunderson S.I. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 2338–2352.
- Tian B., Pan Z., Lee J.Y. // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 156–165.
- Berg M.G., Singh L.N., Younis I., Liu Q., Pinto A.M., Kaida D., Zhang Z., Cho S., Sherrill-Mix S., Wan L., Dreyfuss G. // *Cell.* 2012. V. 150. P. 53–64.
- Cheng Y., Miura R.M., Tian B. // *Bioinformatics.* 2006. V. 22. P. 2320–2325.
- McQuilton P., St Pierre S.E., Thurmond J., the FlyBase Consortium // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. D706–D714.

27. Graveley B.R., Brooks A.N., Carlson J.W., Duff M.O., Landolin J.M., Yang L., Artieri C.G., van Baren M.J., Boley N., Booth B.W., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. P. 473–479.
28. Celniker S.E., Dillon L.A., Gerstein M.B., Gunsalus K.C., Henikoff S., Karpen G.H., Kellis M., Lai E.C., Lieb J.D., MacAlpine D.M., et al. // *Nature*. 2009. V. 459. P. 927–930.
29. Hernandez G., Vazquez-Pianzola P., Sierra J.M., Rivera-Pomar R. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 1783–1797.
30. Langemeier J., Radtke M., Bohne J. // *RNA Biol*. 2013. V. 10. P. 180–184.
31. Langemeier J., Schrom E.M., Rabner A., Radtke M., Zychlinski D., Saborowski A., Bohn G., Mandel-Gutfreund Y., Bodem J., Klein C., Bohne J. // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 4035–4044.
32. West S., Gromak N., Proudfoot N.J. // *Nature*. 2004. V. 432. P. 522–525.
33. Luo W., Johnson A.W., Bentley D.L. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 954–965.
34. Dye M.J., Gromak N., Proudfoot N.J. // *Mol. Cell*. 2006. V. 21. P. 849–859.

УДК 577.1 577.15

# Моделирование трехмерной структуры гидролазы эфиров альфа-аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*

С. А. Зарубина<sup>1,2</sup>, И. В. Упоров<sup>1</sup>, Е. А. Федорчук<sup>1,2</sup>, В. В. Федорчук<sup>1,2</sup>, А. В. Складенко<sup>4</sup>,  
С. В. Яроцкий<sup>4</sup>, В. И. Тишков<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

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

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

<sup>4</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика), 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

\*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2013

**РЕФЕРАТ** Гидролаза эфиров альфа-аминокислот (АЕН, [КФ 3.1.1.43]) является перспективным биокатализатором синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков – как пенициллинов, так и цефалоспоринов. Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген АЕН из *Xanthomonas rubrilineans* (ХрАЕН). В представленной работе с целью рационального дизайна ХрАЕН методом гомологичного моделирования построена структура этого фермента и проведен анализ его активного центра. Идентифицированы остатки, образующие каталитическую триаду (Ser175, His341 и Asp308), а также остатки, входящие в оксианионный центр (Tyr83 и Tyr176) и карбоксилатный кластер (карбоксильные группы остатков Asp311, Asp209 и Glu310). Показано, что оптимальная конформация остатков каталитической триады реализуется при суммарном заряде карбоксилатного кластера, равного  $-1$ . С помощью докинга получены структуры комплексов ХрАЕН с ампициллином, амоксициллином, цефалексином, метиловыми эфирами *D*-фенилглицина и 4-окси-*D*-фенилглицина. С помощью моделирования комплексов фермента с различными субстратами проведен анализ полученных структур и определен ряд антибиотиков, при синтезе которых фермент ХрАЕН будет наиболее эффективен.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гидролаза эфиров альфа-аминокислот, *Xanthomonas rubrilineans*, компьютерное моделирование, докинг, ферментативный синтез антибиотиков, белковая инженерия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АЕН – гидролаза эфиров  $\alpha$ -аминокислот (alpha-amino acid ester hydrolase); РА – пенициллинацилаза; ХрАЕН, ХсАЕН, АсАЕН – гидролазы эфиров  $\alpha$ -аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*, *X. citri*, *Acetobacter turbidans* соответственно; DPG – *D*-фенилглицин; Met-DPG – метиловый эфир DPG.

## ВВЕДЕНИЕ

Полусинтетические  $\beta$ -лактамные антибиотики широко используются для борьбы с патогенными микроорганизмами и занимают более половины мирового рынка всех антибактериальных препаратов [1]. В настоящее время эти антибиотики получают с использованием фермента пенициллинацилазы (РА), который катализирует реакцию переноса ацильной группы из соответствующего амида на  $\beta$ -лактамное ядро (схема) [2, 3]. В случае РА донорами ацильной части служат амиды, которые обладают меньшей реакционной способностью по сравнению с соответствующими эфирами. Поэтому процесс образования ацил-

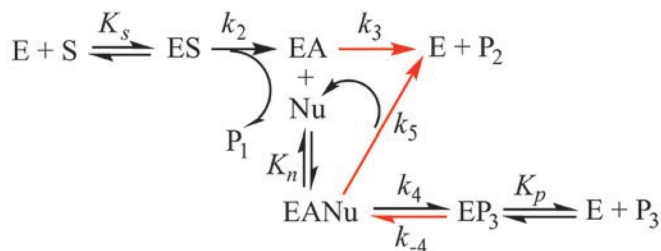
фермента (стадия с константой  $k_2$ ) может протекать гораздо быстрее, если источником ацильной группы служит соответствующий эфир, однако для этого необходимо использовать гидролазу, а не амидазу, каковой является РА. Поскольку гидролаза более активна с эфирами, а целевой продукт – амид, то скорость побочной реакции его гидролиза (стадия с константой  $k_3$ ), катализируемой гидролазой, будет более низкой по сравнению с амидазой, что должно повысить соотношение скоростей синтеза/гидролиза. Таким образом, использование гидролазы вместо амидазы позволяет повысить эффективность процесса синтеза антибиотиков сразу на двух этапах.



Один из таких ферментов – гидролаза, специфичная к эфирам  $\alpha$ -аминокислот (АЕН, [КФ 3.1.1.43]). В отличие от пенициллинацилаз, выделенных и охарактеризованных из большого количества источников, данных об АЕН совсем немного. В настоящее время опубликована информация об АЕН, выделенных из бактерий *Acetobacter turbidans* ATCC 9325 (ActAEN) [4, 5], *Xanthomonas citri* IF0 3835 (XcAEN) [6], *X. campestris pv. campestris* ATCC 33913 [7] и ряда других источников. В базе трехмерных структур Protein Data Base (PDB) представлены структуры только двух ферментов, проявивших наибольшую активность в синтезе антибиотиков – ActAEN и XcAEN. В случае XcAEN имеется структура только свободного фермента дикого типа (PDB ID: 1MPX, разрешение 1.9 Å) [6]. В случае ActAEN имеется как структура свободного фермента дикого типа (PDB ID: 2B9V, разрешение 2.0 Å), так и в комплексе с *D*-фенилглицином (PDB ID: 2B4K, 3.3 Å), а также мутанта ActAEN Y206A (PDB ID: 1RYU, разрешение 2.8 Å) и комплекса неактивного мутанта ActAEN S205A с ампициллином (PDB ID: 1NX9, разрешение 2.2 Å) [5].

Нами недавно был клонирован ген *AEN* из бактерий *X. rubrilineans* (XrAEN). Этот штамм был выделен в Государственном научном центре по антибиотикам. Фермент был успешно экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Предварительные эксперименты подтвердили высокую эффективность рекомбинантной XrAEN в синтезе ряда антибиотиков, однако для эффективного практического применения фермента необходимы дополнительные эксперименты по инженерии XrAEN, направленные на улучшение свойств с заданными субстратами. Один из наиболее эффективных подходов белковой инженерии – метод рационального дизайна. Этот метод предполагает введение в белковую глобулу точечных аминокислотных замен, которые выбирают на основе анализа трехмерной структуры биокатализатора. Для того чтобы использовать этот метод, необходимо иметь структуру исследуемого фермента, которая может быть получена как экспериментально (с помощью рентгеноструктурного анализа или ЯМР), так и с помощью компьютерного моделирования. Последний подход все чаще используется в настоящее время благодаря развитию методов компьютерного моделирования и непрерывному росту числа определенных экспериментально структур в банке PDB.

Цель данной работы состояла в построении модельной структуры XrAEN – как свободного фермента, так и в комплексе с ключевыми соединениями, используемыми при синтезе  $\beta$ -лактамных антибиотиков.



Общая кинетическая схема синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков [2]. E – фермент; S – субстрат, донор ацильной части; ES – фермент-субстратный комплекс; EA – ацилфермент; P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> – продукты гидролиза субстрата S; Nu – нуклеофил, EANu – комплекс ацилфермента с нуклеофилом, EP<sub>3</sub> – комплекс фермента и целевого антибиотика, P<sub>3</sub> – целевой антибиотик. K<sub>s</sub> – константа диссоциации комплекса фермента с субстратом; K<sub>n</sub> – константа диссоциации комплекса ацилфермента с нуклеофилом; K<sub>p</sub> – константа диссоциации фермента с продуктом синтеза антибиотика; k<sub>2</sub> – константа скорости образования ацилфермента; k<sub>3</sub> – константа скорости гидролиза ацилфермента; k<sub>4</sub>, k<sub>-4</sub> – прямая и обратная константы скорости химической стадии образования и гидролиза целевого антибиотика соответственно; k<sub>5</sub> – константа скорости гидролиза комплекса ацилфермента с нуклеофилом

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выравнивание аминокислотных последовательностей XrAEN и известных структур АЕН проводили с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor ClustalW Multiple Alignment [8].

Компьютерная модель трехмерной структуры XrAEN получена методом гомологичного моделирования с использованием пакета программ Insight II. В качестве базовой использовали структуру АЕН из *X. citri* (XcAEN), представленную в базе PDB, с кодом 1MPX (разрешение 1.9 Å) [6]. Далее для снятия возможных конформационных напряжений структуры была проведена оптимизация структуры с помощью молекулярной механики (модуль Discover\_3 пакета программ Insight II, 300 шагов минимизации, силовое поле CVFF [9]). Окончательная оптимизация структуры выполнена с помощью молекулярной динамики (5 пс при температуре 298 К). Докинг субстратов и продуктов в активный центр модельной структуры XrAEN проводили методом Монте-Карло с помощью модуля Docking пакета программ Insight II. В дальнейшем была выполнена оптимизация структуры – 300 шагов минимизации (силовое поле CVFF) и молекулярная динамика (1 пс при температуре 298 К).

Для получения изображений белковой глобулы, а также комплексов с субстратами использовали пакет программ Accelrys Discovery Studio 2.5 [10].

	65	75	85	95	105	115
<i>X. rubrilineans</i>	LHTVIVLPKG	AHGAPILLTR	TPYDASGRAS	RLA-SPHMRD	LLPQGDEVFV	DGGYIRVVFQD
<i>X. citri</i>	LHTVIVLPKG	AKNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>X. oryzae</i>	LHTVIVLPKG	AKNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>X. campestris</i>	LHTVIVLPKG	ARNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>A. turbidans</i>	LYTVIVIPKN	ARNAPILLTR	TPYNAKGRAN	RVPNALTMRE	VLPQGDDVFV	EGGYIRVVFQD
	125	135	145	155	165	175
<i>X. rubrilineans</i>	IRGKYGSEGD	YVTRPLRGP	LNPTKVDHAT	DAWDTIDWLK	KHVPESNGKV	GMIGSSYEGF
<i>X. citri</i>	VRGKYGSEGD	YVMTRPLRGP	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNVSESNKGV	GMIGSSYEGF
<i>X. oryzae</i>	VRGKYGSEGD	YVMTRPLRGP	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNVSESNKGV	GMIGSSYEGF
<i>X. campestris</i>	VRGKYGSEGE	YVMTRPLRGA	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNLKESNGKV	GMIGSSYEGF
<i>A. turbidans</i>	IRGKYGSQGD	YVMTRPPHGP	LNPTKTDETT	DAWDTVDWLK	HNVPESENGRV	GMTGSSYEGF
	185	195	205	215	225	235
<i>X. rubrilineans</i>	TVVVALADPH	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WLNYGAFRQV	NLDYFTGQMT	RRGKGEGIPR
<i>X. citri</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WFNYGAFRQV	NFDYFTGQLS	KRGKGAGIAR
<i>X. oryzae</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMVDGWMGDD	WFNDGAFRQV	NFDYFTAQLS	KRGKGAGIPR
<i>X. campestris</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WFNYGAFRQV	NFDYFTGQLS	KRGKGAGIPR
<i>A. turbidans</i>	TVVVALLDPH	PALKVAAPES	PMVDGWMGDD	WFHYGAFRQV	AFDYFVSQMT	ARGGGNDIPR
	245	255	265	275	285	295
<i>X. rubrilineans</i>	QGYDDYSNFL	RAGSAGDYAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHPAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. citri</i>	QGHDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. oryzae</i>	QGDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. campestris</i>	QGHDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	SFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>A. turbidans</i>	RDADDYTNFL	KAGSAGSFAT	QAGLDQYPFW	QRMHAHPAYD	AFWQGGALDK	ILAQRKPTVP
	305	315	325	335	345	355
<i>X. rubrilineans</i>	TMWLQGLWDQ	EDMWGAIHSY	EAMEPRDTGN	DKNYLVMGPW	RHSQVNYEGA	SLGALQDFGD
<i>X. citri</i>	TMWLQGLWDQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKRN	TLNYLVMGPW	RHSQVNYDGS	ALGALNFEFGD
<i>X. oryzae</i>	TMWLQGLWDQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKSN	TLNYLVMGPW	RHSQVNYDGS	ALGALSFEFGD
<i>X. campestris</i>	TMWLQGLWDQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKSN	KLNYLVMGPW	RHSQVNSDAS	SLGALNFDGD
<i>A. turbidans</i>	MLWEQGLWDQ	EDMWGAIHAW	QALKDADVKA	P-NLTVLVMGPW	RHSGVNYNGS	TLGPLEFEFGD

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей XrAEN, AEN из *X. citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* и *A. turbidans* в районе активного центра. Красным цветом выделены остатки каталитической триады, фиолетовым – два остатка Tyr из оксианионного центра и зеленым – три остатка карбоксилатного кластера

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа включала в себя следующие этапы:

- множественное выравнивание аминокислотной последовательности XrAEN с известными последовательностями AEN для выявления консервативных участков, в первую очередь остатков активного центра, и выбора оптимальной структуры, используемой в качестве базовой;
- построение трехмерной структуры XrAEN методом гомологичного моделирования с использованием опорного фермента, выбранного на предыдущем этапе;
- уточнение полученной структуры фермента XrAEN;
- встраивание в модельную структуру XrAEN различных субстратов и продуктов ферментативной реакции.

## Выравнивание аминокислотных последовательностей AEN из различных источников

Известно, что на точность моделирования в первую очередь влияют два фактора – степень гомологии между моделируемым и опорным ферментами, чья структура используется в качестве базовой, а также разрешение базовой структуры. Кроме того, даже при высокой гомологии точность моделирования будет сильно зависеть от количества и длины разрывов/вставок в выравнивании аминокислотных последовательностей моделируемого и опорного ферментов. Чем их меньше – тем выше будет точность моделирования. Поэтому для выбора базовой структуры нами проведено выравнивание аминокислотной последовательности нашего фермента и последовательностей двух AEN с известными структурами –



из *X. citri* (XcAEN) и *A. turbidans* (ActAEN), а также двух высокогомологичных АЕН из *X. campestris pv. campestris* и *X. oryzae*. Отметим, что опубликованы также данные об АЕН из *A. pasteurianus*, по аминокислотной последовательности полностью идентичной ActAEN, поэтому в выравнивании она не приведена.

Результаты выравнивания представлены на *рис. 1*. Из данных по выравниванию следует, что наиболее высокой гомологией по отношению XrAEN обладает XcAEN (84%). Чуть меньше она у АЕН из *X. campestris pv. campestris* и *X. oryzae* (83%). Гомология между XrAEN и ActAEN намного ниже – 62%. Кроме того, из *рис. 1* видно, что в выравнивании аминокислотных последовательностей исследуемого фермента и других АЕН бактерий рода *Xanthomonas* отсутствуют делеции и вставки, в то время как в случае ActAEN в выравнивании имеется одна делеция и одна вставка из одного аминокислотного остатка каждая.

Таким образом, исходя из результатов выравнивания, из двух экспериментально определенных структур – ActAEN и XcAEN, в качестве опорной была выбрана структура фермента XcAEN (PDB ID: 1MPX [6]). Кроме того, выбранная структура XcAEN 1MPX имеет немного более высокое разрешение, чем структура свободной ActAEN 2B9V (1.9 и 2.0 Å соответственно).

### Анализ активного центра XrAEN

Данные выравнивания аминокислотных последовательностей позволили определить также функционально важные остатки активного центра XrAEN. В отличие от пенициллинацилазы G (PA), состоящей из двух различных субъединиц, XrAEN представляет собой гомотетрамер из четырех идентичных субъединиц, в каждой из которых находится свой активный центр. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [4–7], характерной особенностью гидролаз эфиров  $\alpha$ -аминокислот является присутствие в их структуре трех ключевых групп аминокислотных остатков:

1) системы переноса протона для активации каталитического остатка серина. Это классическая каталитическая триада для сериновых гидролаз, у фермента XrAEN она образована остатками Ser175, His341 и Asp308 (*рис. 1*);

2) оксианионного центра, который в XrAEN формируется двумя остатками Tyr83 и Tyr176, и необходим для стабилизации отрицательного заряда на остатке каталитического Ser175;

3) карбоксилатного кластера, в который входят три карбоксильные группы двух остатков аспарагиновой кислоты (Asp311, Asp209) и одного остатка глутаминовой кислоты (Glu310). Отрицательно заряженный карбоксилатный кластер участвует в свя-

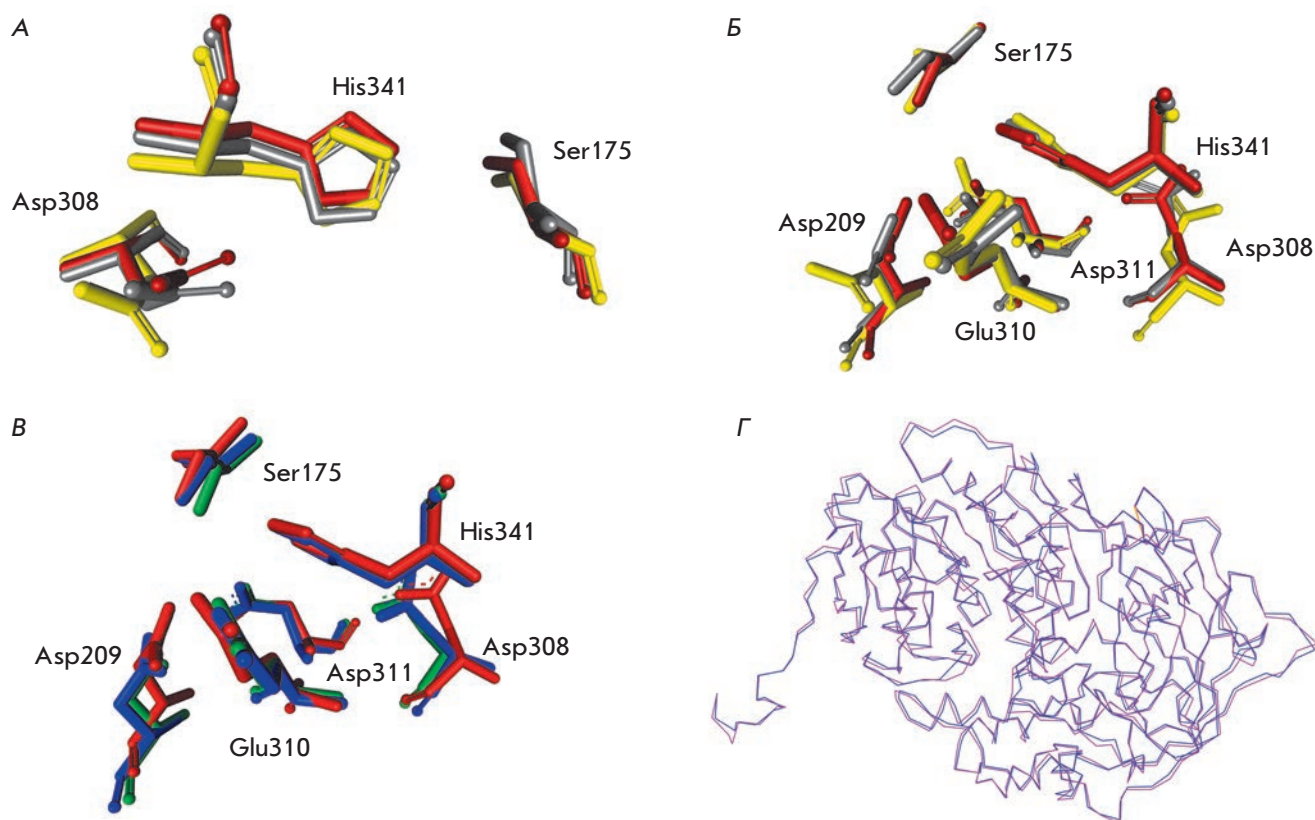
зывании положительно заряженной аминокислотной группы ацильной части субстрата в  $\alpha$ -положении, что и обеспечивает высокую специфичность XrAEN именно к  $\alpha$ -аминокислотам.

Кроме того, функционально важным является остаток Tyr223, который участвует в связывании фенильной части субстрата благодаря стэкинг-взаимодействию, что способствует правильной ориентации субстрата в активном центре фермента.

### Компьютерное моделирование структуры XrAEN

Построение трехмерной структуры XrAEN выполняли в два этапа. Сначала методом гомологичного моделирования с помощью сервера SWISS-MODEL получили предварительную структуру тетрамерного фермента XrAEN [11]. Далее эту структуру дополнительно оптимизировали, для чего была выполнена релаксация структуры, чтобы снять возможные конформационные напряжения с помощью 300 шагов минимизации с использованием модуля Discover\_3 пакета программ Insight II. Анализ структуры активного центра в полученной на данном этапе модельной структуре XrAEN показал, что взаимная ориентация остатков Ser175, His341 и Asp308, составляющих каталитическую триаду, неоптимальна для осуществления каталитической функции (*рис. 2А,Б*, остатки показаны желтым цветом). Из *рис. 2* видно, что карбоксильная группа остатка Asp308 обращена в сторону от имидазольного кольца His341. Было высказано предположение, что возможной причиной такой неоптимальной ориентации является слишком большой отрицательный заряд, присвоенный при проведении моделирования отрицательно заряженному карбоксилатному кластеру, состоящему из карбоксильных групп остатков Asp209, Glu310 и Asp311. Первоначально в исходной структуре всем карбоксильным группам в остатках карбоксилатного кластера было присвоено по отрицательному заряду, что привело к образованию суммарного заряда  $-3$ . Известно, что при сближении карбоксильных групп в полимерах, как правило, не происходит полной диссоциации всех групп. Поэтому, предполагая, что суммарный заряд на карбоксилатном кластере равен  $-2$  (*рис. 2А,Б*, остатки показаны серым цветом) и  $-1$  (*рис. 2А,Б*, остатки показаны красным цветом), нами была проведена дополнительная оптимизация структуры. Из *рис. 2А,Б* видно, что по мере уменьшения общего отрицательного заряда на карбоксилатном кластере наблюдается все более близкая к правильной ориентация карбоксильной группы остатка Asp308 из каталитической триады относительно имидазольного кольца His341, при этом также в направлении имидазольного кольца His341 происходит движение и ОН-группы каталитического остатка





**Рис. 2.** А и Б – оптимизация структуры активного центра в модельной структуре XrAEN. Показаны взаимная ориентация только остатков каталитической триады и взаимная ориентация остатков каталитической триады и карбоксилатного центра (А и Б соответственно). Желтым, серым и красным цветом показаны остатки в структурах, в которых суммарный заряд на карбоксилатном кластере составлял  $-3$ ,  $-2$  и  $-1$  соответственно. В – наложение остатков активного центра и карбоксилатного кластера в модельной структуре XrAEN (показаны красным цветом) и в экспериментальных структурах XcAEN и ActAEN (показаны зеленым и синим цветом соответственно). Г – наложение  $C_{\alpha}$ -атомов структур XrAEN и XcAEN (показаны фиолетовым и синим цветом соответственно). Нумерация остатков дана по последовательности XrAEN

Ser175 (рис. 2А). В результате все остатки, входящие в каталитическую триаду, имеют оптимальную конфигурацию для осуществления реакции. Кроме того, одного отрицательного заряда на карбоксилатном кластере вполне достаточно для связывания положительно заряженной аминокислотной группы субстрата. После связывания на карбоксилатном кластере не будет отрицательного заряда, который отрицательно влиял на диссоциацию ОН-группы каталитического остатка Ser175.

На рис. 2В представлены результаты наложения остатков каталитической триады и карбоксилатного кластера оптимизированной модельной структуры XrAEN по отношению к аналогичным остаткам в структурах ActAEN и XcAEN, определенных с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB ID: 2B9V [5] и 1MPX [6] соответственно). Из рис. 2В хо-

рошо видно, что пространственное расположение остатков активного центра во всех трех структурах практически идентично: одинаковые положения занимают каталитические остатки Ser175 и His341 и карбоксилатного кластера, при этом отмечено только очень небольшое отклонение в конформации Asp308.

На рис. 2Г приведено наложение положений  $C_{\alpha}$ -атомов в структурах XrAEN и XcAEN. Видно, что общий фолдинг наложенных ферментов практически одинаков, причем наименьшее отклонение наблюдается в районе активного центра, а наибольшее – на периферии белковой глобулы. Среднее квадратичное отклонение  $C_{\alpha}$ -атомов между модельной структурой XrAEN и опорной структурой XcAEN составило всего  $0.7 \text{ \AA}$ . В случае наложения структур XrAEN и ActAEN среднее квадратичное отклонение

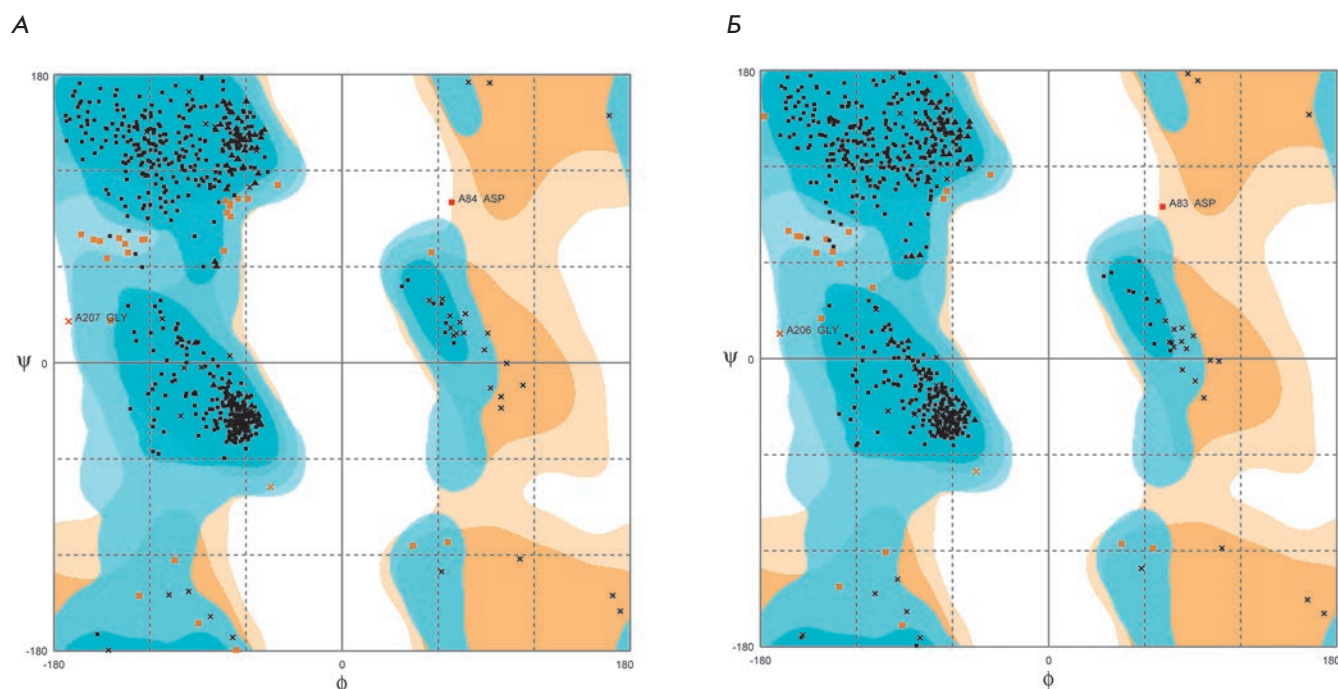


Рис. 3. Карта Рамачандрана для модельной структуры XrAEN (А) и экспериментально определенной структуры апо-XсАЕН PDB 1MPX (Б). Разница в обозначениях остатков на единицу связана с тем, что в последовательности XrAEN учтен первый остаток Met, а в работе [6] использована нумерация аминокислотных остатков без остатка Met

составляет 1.1 Å, что и следовало ожидать из-за более низкой гомологии между этими ферментами.

Далее был проведен сравнительный анализ полученной модельной структуры с целью выявления остатков с неоптимальной конфигурацией. Были построены карты Рамачандрана для модельной структуры XrAEN и экспериментальной структуры XсАЕН (рис. 3А,Б соответственно). Из рис. 3 хорошо видно, что большинство остатков в обеих структурах находятся в оптимальных областях значений углов  $\psi$  и  $\phi$ . Фактически в неоптимальной конформации находится только один остаток – Asp84 в XrAEN и Asp83 в XсАЕН, причем значения углов  $\psi$  и  $\phi$  этого остатка в модельной и экспериментальной структурах очень близки. Этот остаток расположен около входа в активный центр и находится в области изгиба между  $\alpha$ -спиралью и  $\beta$ -тяжом (рис. 4А). Это означает, что существует некоторая напряженность между данными субъединицами. Причина такого отклонения от неоптимальных значений углов в настоящее время неясна. Однако следует отметить, что подобные отклонения очень часто встречаются в случае остатков, расположенных именно в изгибах, соединяющих элементы вторичной структуры. Например, такие же значения углов  $\psi$  и  $\phi$  имеет остаток Ala198 в формилдегидрогеназе из бактерии *Pseudomonas* sp. 101 дикого типа [PDB 2NAC].

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод, что модельная структура XrAEN достоверна, построена с высокой точностью и хорошо согласуется со структурой опорного фермента XсАЕН, а также со структурой ActAEN. На рис. 4 приведена структура мономерного и тетрамерного фермента для докинга субстратов и продуктов в активный центр фермента.

#### Докинг субстратов и продуктов в активный центр XrAEN

На следующем этапе мы провели встраивание ряда субстратов и продуктов в активный центр XrAEN. Процедура докинга описана в «Экспериментальной части». В связи с тем, что в банке трехмерных структур представлены данные только для свободного апофермента гидролазы XсАЕН – наиболее близкого структурного гомолога нашего фермента, полученные в результате докинга структуры комплексов XrAEN сравнивали с использованием аналогичных или близких экспериментально определенных структур ActAEN.

Для ActAEN в PDB имеется структура его комплекса с D-фенилглицином (DPG) (PDB ID: 2B4K [5]). Однако в случае XrAEN больший интерес представляет структура в комплексе с метиловым эфиром

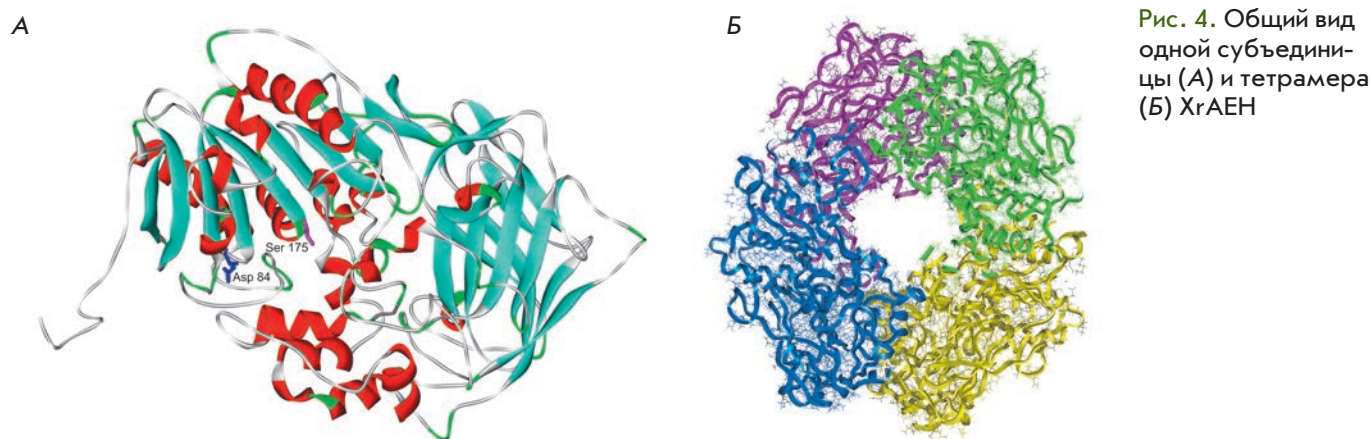


Рис. 4. Общий вид одной субъединицы (А) и тетрамера (Б) XrAEN

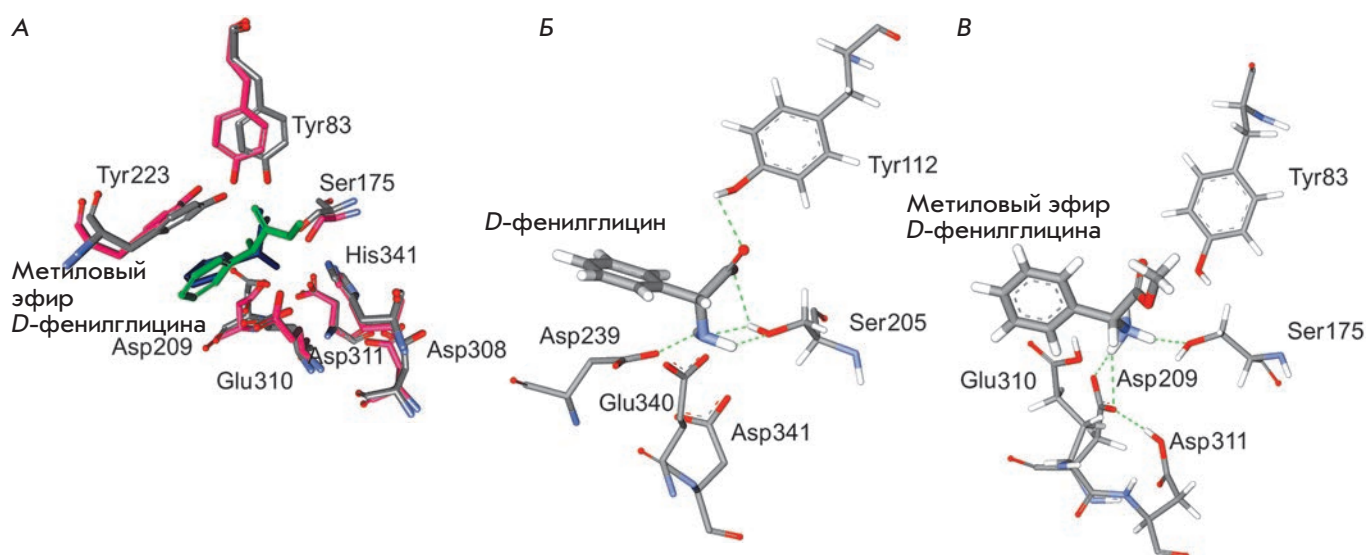


Рис. 5. А – наложение структур комплексов Met-DPG с XrAEN и DPG с ActAEN. Розовым цветом выделен фермент ActAEN, серым – XrAEN, зеленым – субстрат Met-DPG, синим – DPG. Нумерация остатков дана по последовательности XrAEN. Б и В – взаимодействие остатков активного центра со связанным лигандом в комплексах ActAEN с DPG и XrAEN с Met-DPG соответственно

*D*-фенилглицина (Met-DPG), который применяют в качестве ацилирующего агента при синтезе ампициллина с помощью АЕН. На рис. 5А представлено наложение полученной структуры со структурой 2В4К. Видно, что общий фолдинг структур двойных комплексов очень близок, среднеквадратичное отклонение  $C_{\alpha}$ -атомов всей белковой глобулы составляет 1.1 Å (напомним, что среднеквадратичное отклонение  $C_{\alpha}$ -атомов всей белковой глобулы свободных ферментов XrAEN и ActAEN также составляло 1.1 Å). Кроме общего фолдинга также наблюдается практически полное совпадение конформаций ряда остатков активного центра (имидазольное кольцо остатка His341 и карбоксильная группа остатка Asp308 из каталитической триады, карбоксильные группы

остатков карбоксилатного центра Glu310 и Asp311). Однако из результатов наложения видно, что существуют заметные различия в конформации ряда других остатков. В первую очередь, это гидроксильная группа каталитического остатка Ser175 и фенольная группа остатка Tyr83 из оксианионного центра, а также аминогруппа субстрата Met-DPG. Детальный анализ экспериментальной и модельной структур (рис. 5Б,В), в которых также показаны атомы водорода, позволяет легко объяснить эти различия. В экспериментальной структуре 2В4К (рис. 5Б) мы имеем комплекс ActAEN с продуктом реакции, в котором остатки активного центра Ser205 и Tyr112 (Ser175 и Tyr83 в XrAEN соответственно) находятся в состоянии крайне неоптимальном для катализа – во-



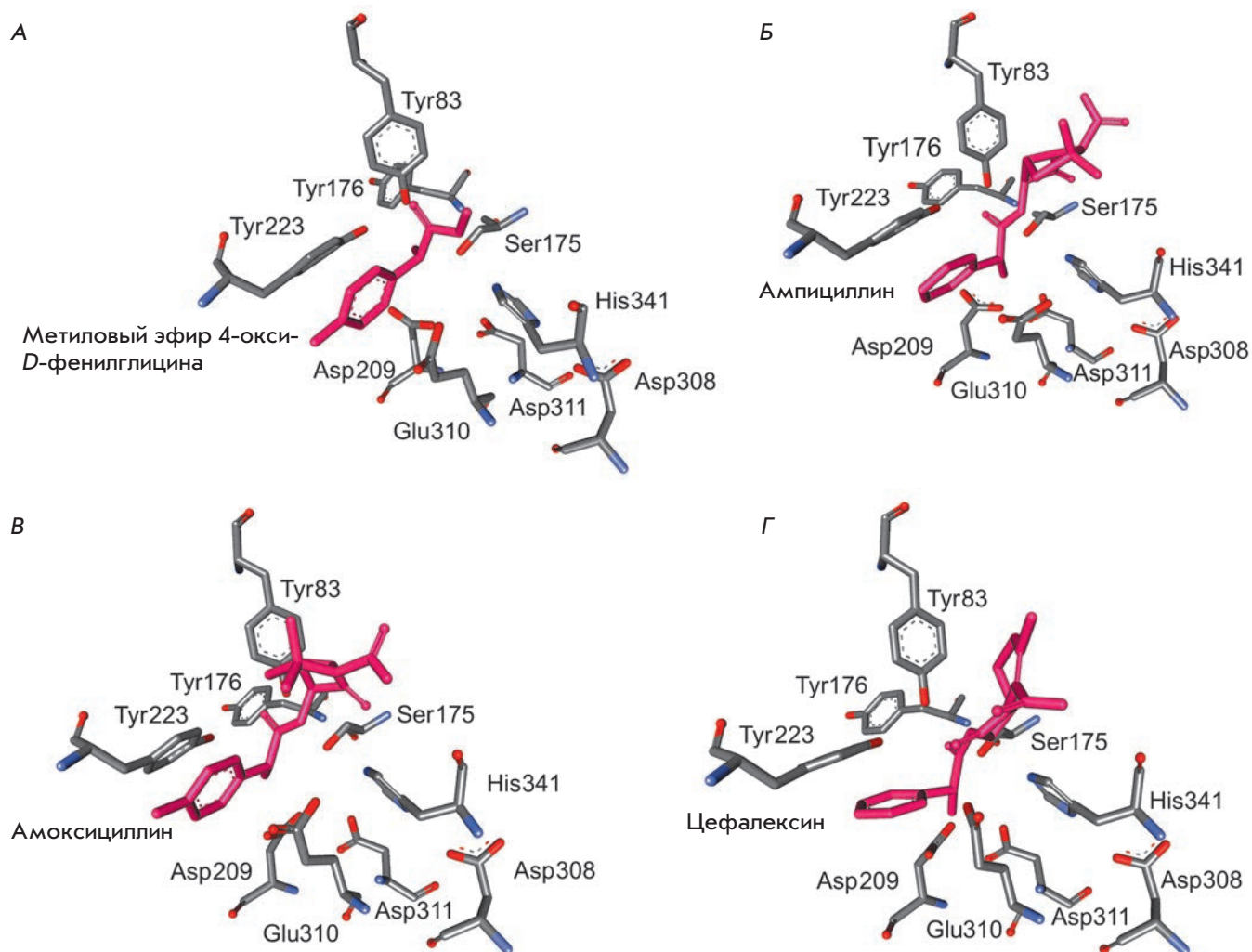


Рис. 6. Докинг метилового эфира 4-окси-*D*-фенилглицина, ампициллина, амоксициллина и цефалексина в активный центр XrAEN (соответственно А – Г)

дород оксигруппы фенольного кольца Tyr112 образует водородную связь с кислородом карбоксильной группы DPG. В результате это фенольное кольцо зафиксировано вдали от оксигруппы каталитического Ser205 и в такой конформации просто не способно выполнять роль оксианионного центра. В свою очередь, сама оксигруппа каталитического Ser205 участвует в образовании трех водородных связей, причем водород этой группы за счет двух водородных связей повернут в сторону имидазольного кольца остатка His, который акцептирует этот протон для получения отрицательно заряженного атома кислорода на остатке Ser, необходимого для осуществления катализа. Кроме того, аминогруппа DPG также повернута в сторону от карбоксилатного центра за счет двух водородных связей с гидроксидом каталитического Ser205. В ре-

зультате только одна карбоксильная группа остатка Asp239 (Asp209 в XrAEN) также взаимодействует с аминогруппой DPG (рис. 5Б).

Совершенно иная картина наблюдается в модельной структуре XrAEN с субстратом Met-DPG (рис. 5В). Из рис. 5В хорошо видно, что фенольная группа остатка Tyr83 находится в конформации, оптимальной для выполнения роли оксианионного центра, кислород оксигруппы каталитического остатка Ser175 образует всего одну водородную связь, а атом водорода этой группы развернут в сторону имидазольного кольца остатка His341 из системы переноса протона. Расстояние между атомом Oγ Ser175 и атакуемым атомом углерода в субстрате составляет всего 2.9 Å, а угол атаки равен 115.1°, что близко к значению 109.5°, оптимальному для тетраэдриче-

Численные результаты моделирования связывания субстратов и продуктов ферментативной реакции в активном центре фермента XrAEN

Встраиваемая молекула	Расстояние от Oγ Ser175, Å	Углы атаки атома Oγ Ser175, град
Метилловый эфир D-фенилглицина	2.9	115.1
Ампициллин	2.7	80.9
Метилловый эфир 4-окси-D-фенилглицина	2.9	128.4
Амоксициллин	3.0	103.2
Цефалексин	2.9	73.0

ской конформации. Таким образом, полученная модель комплекса Met-DPG с XrAEN, с точки зрения конфигурации, оптимальна для осуществления катализа. Несколько иная картина наблюдается в случае комплекса XrAEN с метиловым эфиром 4-окси-D-фенилглицина, который используется в качестве донора ацильной группы при синтезе амоксициллина (рис. 6А). Наличие дополнительной оксигруппы в ароматическом кольце этого субстрата приводит к тому, что при его встраивании в активный центр фермента возникают небольшие стерические затруднения. В результате угол атаки между углеродом карбоксила и атомом Oγ Ser175 увеличивается до 128.4° (таблица), что конечно хуже, чем в случае Met-DPG, но вполне достаточно для эффективного протекания реакции.

Нами также проведено моделирование структур комплексов XrAEN с целевыми продуктами реакции синтеза антибиотиков: ампициллином и амоксициллином (группа пенициллинов) и цефалексином (группа цефалоспоринов). Результаты докинга представлены на рис. 6Б–Г. Согласно результатам наложения структур комплексов ампициллина и амоксициллина с XrAEN, среднеквадратичное отклонение C<sub>α</sub>-атомов всей белковой глобулы составляет всего 0.005 Å, однако конформации антибиотиков, связанных в активном центре, различаются. Как и в случае субстратов – доноров ацильной части, расстояние от атома Oγ каталитического остатка Ser175 фермента до амидного углерода продукта (он же углерод карбоксила в субстрате) составляет 2.7, 3.0 и 2.9 Å для ампициллина, амоксициллина и цефалексина соответственно,

однако углы совсем разные. В случае ампициллина величина угла составляет 80.9°, что намного меньше оптимального значения 109.5°. Для цефалексина (угол 73.0°) эта разница еще больше. Таким образом, вероятность гидролиза этих двух антибиотиков в активном центре XrAEN очень низкая, что нельзя сказать про амоксициллин, у которого угол атаки 103.2° близок к оптимальному. Это означает, что в случае амоксициллина соотношение скоростей синтез-гидролиз (и, как следствие, выход целевого продукта) будет ниже, чем у ампициллина, что хорошо согласуется с экспериментальными данными [12], полученными при изучении эффективности рекомбинантного фермента в процессах синтеза этих антибиотиков. Однако отметим, что по абсолютным показателям эффективность рекомбинантной XrAEN в процессе синтеза амоксициллина была выше, чем у пенициллинацилазы из *E. coli*.

Таким образом, в данной работе нами построена модельная структура новой гидролазы эфиров α-аминокислот из *X. rubrilineans*, а также получены модельные структуры комплексов этого фермента с рядом субстратов и продуктов. Анализ этих структур показал хорошее соответствие с известными экспериментальными данными как для этого фермента, так и для других AEN, что свидетельствует о высокой точности моделирования. Наиболее интересны, с нашей точки зрения, результаты моделирования структуры комплекса XrAEN с амоксициллином, гораздо более эффективным (и более дорогостоящим) антибактериальным препаратом, чем ампициллин. Именно поэтому амоксициллин используется в комплексе с клавулановой кислотой, ингибитором β-лактамаз (коммерческие названия «Амоксиклав» и «Аугментин»). Как уже отмечалось выше, используемая в настоящее время пенициллинацилаза является эффективным биокатализатором синтеза ампициллина, но она и гораздо менее эффективна в синтезе амоксициллина. Поэтому поиск и разработка новых биокатализаторов синтеза амоксициллина является одной из актуальных задач фармацевтической промышленности. Наличие модельной структуры комплекса XrAEN с амоксициллином открывает возможность увеличения эффективности XrAEN в синтезе амоксициллина с помощью рационального дизайна – одного из наиболее эффективных методов белковой инженерии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (госконтракт № 14.512.11.0066) и РФФИ (грант № 11-04-00962-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elander R.P. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 61. № 5–6. P. 385–392.
2. Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H.J., Švedas V.K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 85. № 3. P. 323–329.
3. Tishkov V.I., Savin S.S., Yasnaya A.S. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 3(6). P. 47–61.
4. Barends Th.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Willams Ch., Wybenga G., Janssen D.B., Dijkstra B.W. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5804–5810.
5. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Jeronimus-Stratingh C.M., Bruins A.P., van der Laan J.-M., Sonke Th., Janssen D.B. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 32. P. 28474–28482.
6. Barends Th.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Hensgens C.M.H., de Vries E.J., Janssen D.B., Dijkstra B.W. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 25. P. 23076–23084.
7. Blum J.K., Bommarius A.S. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010. V. 67. № 1–2. P. 21–28.
8. Hall Th.A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. № 1. P. 95–98.
9. Dauber-Osguthorpe P., Roberts V.A., Osguthorpe D.J., Wolff J., Genest M., Hagler A.T. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1988. V. 4. № 1. P. 31–47.
10. Discovery Studio 2.5 // <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>
11. Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. Suppl 1. P. D387–D392.
12. Yarotsky S.V., Sklyarenko A.V. // *Proc. VII Moscow Intern. Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects Development», March 19–22, 2013. Moscow. Russia. Part 2.* P. 142–143.



УДК 612.017.1-612.018.-573.6.

# Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета

А. Д. Черноусов<sup>1,2</sup>, М. Ф. Никонова<sup>1</sup>, Н. И. Шарова<sup>1</sup>, А. Н. Митин<sup>1</sup>, М. М. Литвина<sup>1</sup>,  
П. Е. Садчиков<sup>1</sup>, И. Л. Гольдман<sup>2</sup>, А. А. Ярилин<sup>1</sup>, Е. Р. Садчикова<sup>2\*</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*E-mail: e.r.sadchikova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.05.2013

**РЕФЕРАТ** Инновационный продукт Неолактоферрин представляет собой естественную комбинацию рекомбинантного лактоферрина человека (90%) и лактоферрина козы (10%), выделенных из молока коз-продуцентов, несущих в геноме полноразмерный ген лактоферрина человека. Изучено действие Неолактоферрина на клетки иммунной системы человека. Неолактоферрин усиливал выработку интерлейкина 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), определял направление дифференцировки предшественников дендритных клеток, усиливал экспрессию факторов транскрипции, ответственных за дифференцировку Th- и Treg-клеток, стимулировал выработку как интерферона- $\gamma$ , так и IL-4. Обогащенный ионами железа Неолактоферрин усиливал синтез провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей  $\alpha$ . Полученные данные свидетельствуют о том, что Неолактоферрин обладает иммуотропной активностью, сдерживает развитие иммунных процессов по воспалительному пути. Обогащение Неолактоферрина ионами железа усиливает его провоспалительную активность.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** воспаление, иммунитет, Неолактоферрин, рекомбинантный лактоферрин человека, факторы транскрипции, цитокины.

## ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (Лф) – ключевой бактерицидный белок грудного молока, обеспечивающий защиту новорожденного ребенка от инфекций. Лф обладает противомикробным [1–3], противовирусным [4–6] и противогрибковым [7, 8] действием. Показано также, что Лф поражает антибиотикостойчивую микрофлору без формирования генетической адаптации к нему микроорганизмов [9, 10]. При совместном применении Лф и антибиотиков наблюдается усиление действия последних [11, 12]. Несмотря на выраженную антимикробную активность, Лф не подавляет жизнедеятельность нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта [13, 14]. Более того, он стимулирует рост бифидобактерий, поставляя необходимые для их жизнедеятельности ионы железа [15]. Среди других биологических активностей Лф основными являются: иммуномодулирующая [9, 16], антиоксидантная [17, 18] и противовоспалительная [19]. Обнаружено, что Лф и его производные (лактоферрицины) подавляют развитие опухолей и метастазов у экспериментальных животных [20–22].

Механизм биологических активностей Лф хорошо изучен [23–25]. Установлено, что бактерицидность

Лф обусловлена не только непосредственным воздействием на патогенные микроорганизмы, но и способностью активировать иммунную систему организма за счет стимуляции врожденного иммунитета, активации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток [26]. Было решено выделить лактоферрин человека (чЛф) в чистом виде и попытаться использовать его в качестве компонента продуктов функционального питания и в составе различных биологически безопасных лекарственных средств нового поколения. Возможность подобного использования чЛф подтверждена в работах сотрудников Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, создавших на основе чЛф, выделенного из грудного молока, высокоэффективные лекарственные средства широкого терапевтического действия [27–30], в том числе и инъекционные [31]. К сожалению, вследствие дефицита грудного молока потребность в чЛф не может быть полностью удовлетворена.

В последнее десятилетие широкое распространение получил лактоферрин, выделенный из коровье-го молока (Bovine lactoferrin, бЛф), биологические активности которого во многом оказались сходными

с чЛф [32, 33]. Несмотря на успехи в использовании бЛф [34], «чужеродный» бЛф решили заменить рекомбинантным лактоферрином человека (рчЛф), как это сделано в случае некоторых других биологически активных белков животных.

Известно, что по аминокислотной последовательности чЛф и бЛф совпадают лишь на 67% [35]. Различия в первичной структуре приводят к различиям во вторичной и третичной структуре этих белков, что может определять их функциональные особенности. Уже выявлены определенные различия в строении рецепторов чЛф и бЛф в различных органах и тканях человека [36]. Установлено, например, что рецептор клеток тонкого кишечника более специфичен к чЛф, чем к бЛф, и это отличие в значительной степени определяется структурой чЛф [37]. Предполагается, что рецептор чЛф участвует во всасывании железа в тонком кишечнике человека [38]. Обычно железо транспортируется через апикальную мембрану тонкого кишечника при помощи транспортера двухвалентных катионов (Divalent metal transporter-1, DMT-1). Железо, связанное с чЛф, не может проникнуть в клетку посредством DMT-1, для этого служит рецептор чЛф. Попав в клетку, чЛф связывается с ядром, где, по видимому, действует в качестве фактора транскрипции и активирует биосинтез таких сигнальных белков, как каспаза-1 и интерлейкин-18, которые затем поступают в циркуляцию как системный сигнал. Этот путь считается минорным, по нему транспортируется ~10% чЛф. Основной путь, по которому чЛф проникает в эпителиальные клетки, приводит к деградации ~90% белка и высвобождению железа.

Рецепторы чЛф, аналогичные рецептору тонкого кишечника, удалось найти в слюнных железах, сердце, скелетных мышцах, надпочечниках и поджелудочной железе [39]. Два других типа рецепторов обнаружены в печени: рецепторный белок липопротеинов низкой плотности (LRP) и асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR).

При расщеплении бЛф и чЛф образуются так называемые лактоферрицины, обозначаемые соответственно символами В [40] и Н [41], которые различаются как по аминокислотной последовательности, так и по биологической активности.

Иммунологи полагают, что полную биологическую безопасность бЛф для человека может гарантировать только применение этого белка в составе пищевых продуктов, тогда как чЛф можно использовать и в составе инъекционных лекарственных средств.

К настоящему времени рчЛф получен в разных странах при помощи современных биотехнологических методов, а также растений [42, 43], микроскопических грибов [44] и животных [45, 46] в качестве продуцентов.

В Российской Федерации в рамках Программы союзного государства (Россия–Белоруссия) рчЛф получен в составе козьего молока [47]. По физико-химическим параметрам и биологической активности рчЛф соответствует природному чЛф [48, 49]. На основе этого белка создан инновационный продукт Неолактоферрин (Неолакт), представляющий собой комбинацию рчЛф и лактоферрина козы (кЛф), присутствующих в молоке трансгенных коз в соотношении рчЛф : кЛф = 90 : 10.

Ранее мы экспериментально установили, что лактоферрин козы усиливает экспрессию гена *NF-κB* и синтез важнейшего для активации врожденного иммунитета фактора некроза опухолей α (TNFα, tumor necrosis factor), но не влияет на активацию синтеза интерлейкина-1 (IL-1, interleukin-1).

В представленной работе изучено совместное действие рчЛф и кЛф на показатели врожденного иммунитета человека. Исследована способность Неолакта с различным насыщением железа – 4% (Fe<sup>-</sup>) и 16% (Fe<sup>+</sup>) активировать врожденный иммунитет, усиливать презентирующую способность дендритных клеток, определять направление дифференцировки предшественников Т-клеток и усиливать синтез основных цитокинов адаптивного иммунного ответа – интерферона-γ (IFNγ, interferon-γ) и IL-4.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

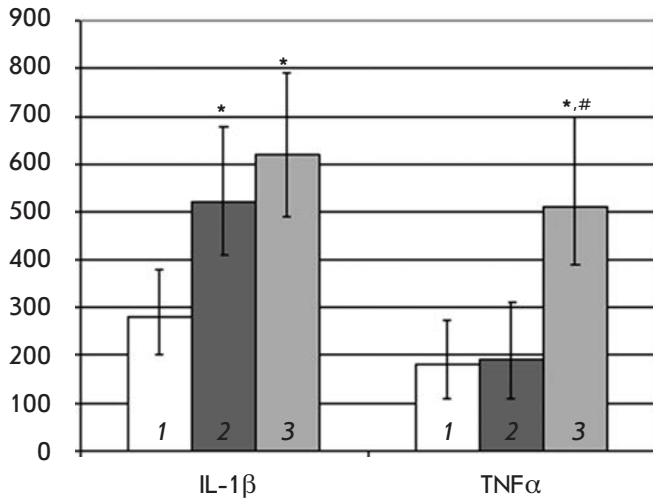
Активность образцов Неолакта оценивали в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мкг/мл при инкубации с исследуемыми клетками в течение 18 ч при 37°C.

Мононуклеары (преимущественно лимфоциты) выделяли из цельной крови человека центрифугированием с использованием одноступенчатого градиента плотности фиколл–верографин (плотность 1.077 г/мл). Прилипающую фракцию получали инкубацией мононуклеаров крови в 24-луночных плашках (Costar, США) в течение 1 ч при 37°C.

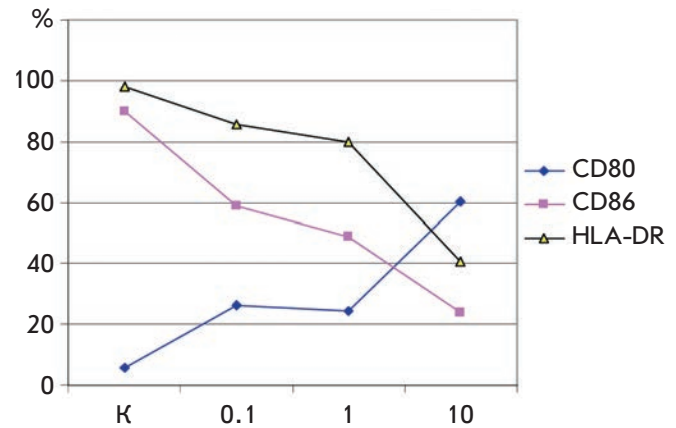
Линия дендритных клеток человека HTSC.IL-10 получена и поддерживается в лаборатории дифференцировки лимфоцитов Института иммунологии [50].

Экспрессию мембранных молекул на поверхности клеток оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии BD FACSCanto II с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентно-изотиоцианатом (анти-CD80, анти-CD123) или фикоэритрином (анти-HLA-DR, анти-CD86) (Caltag, США).

Концентрацию цитокинов в культуральных средах определяли иммуноферментным методом с использованием соответствующих тест-наборов (ОАО «Цитокин», Санкт-Петербург).



**Рис. 1.** Влияние Неолакта (2) и Неолакта, обогащенного железом (3), на секрецию моноцитами цитокинов IL-1β и TNFα. 1 – уровень секреции цитокинов в контроле. По оси ординат: концентрация цитокинов (пг/мл) в культуральной среде моноцитов. Представлены медианы \**p* < 0.05 относительно контроля; # – то же относительно Неолакта. Содержание Неолакта и Неолакта, обогащенного железом, в среде составило 10 мкг/мл



**Рис. 2.** Влияние Неолакта на экспрессию костимулирующих молекул HLA-DR, CD80 и CD86 дендритными клетками линии HTSC.IL-10. Представлены средние значения трех определений. По оси абсцисс – концентрация Неолакта, мкг/мл, по оси ординат – процент клеток, несущих маркер. К – исходная экспрессия костимулирующих молекул, без добавления Неолакта

Внутриклеточные цитокины определяли в мононуклеарах, активированных смесью 4-форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) и иономицина (ионо), в присутствии BD GolgiStop (Becton Dickinson, США) и пермеабилizированных BD-набором (BD Cytotfix/Cetoperm Fixation/Permeabilization Kit) на проточном цитометре с использованием меченых моноклональных антител к цитокинам [51].

Уровень экспрессии генов факторов транскрипции (NF-κB, GATA-3, Tbet, FOXP3 и RORc) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с предварительной обратной транскрипцией. Использовали наборы реагентов TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit и TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) [52]. Уровень экспрессии мРНК определяли относительно экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» β2-микроглобулина (B2M) по формуле:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-((Ct_{BK}^{B2M} - Ct_{B2M}) - (Ct_{BK}^{генX} - Ct_{генX}))}$$

где Ct – пороговый цикл, определяемый на экспоненциальном участке кривой накопления ДНК, BK – внутренний контроль.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Показатели представляли в виде Ме (L–H),

где Ме – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна–Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами обнаружено, что Неолакт активирует врожденный иммунитет. В концентрации 10 и 100 мкг/мл он значительно усиливал секрецию IL-1β моноцитами крови человека, не влияя на выработку TNFα.

Обогащение Неолакта ионами железа индуцировало появление у него способности усиливать выработку TNFα (рис. 1). Таким образом, провоспалительная активность Неолакта ограничивалась повышением выработки IL-1β моноцитами крови, тогда как его обогащение ионами железа существенно активировало врожденный иммунитет и усиливало проявления провоспалительных эффектов.

Влияние Неолакта на экспрессию мембранных молекул, играющих ключевую роль в презентации антигена, определенное на дендритных клетках линии HTSC.IL-10, представлено на рис. 2. Неолакт в трех испытанных дозах значительно снижал число клеток, экспрессирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR) и костимулирующую молекулу CD86, которые исходно были представлены почти на всех клетках линии, и повышал численность клеток, несущих дру-



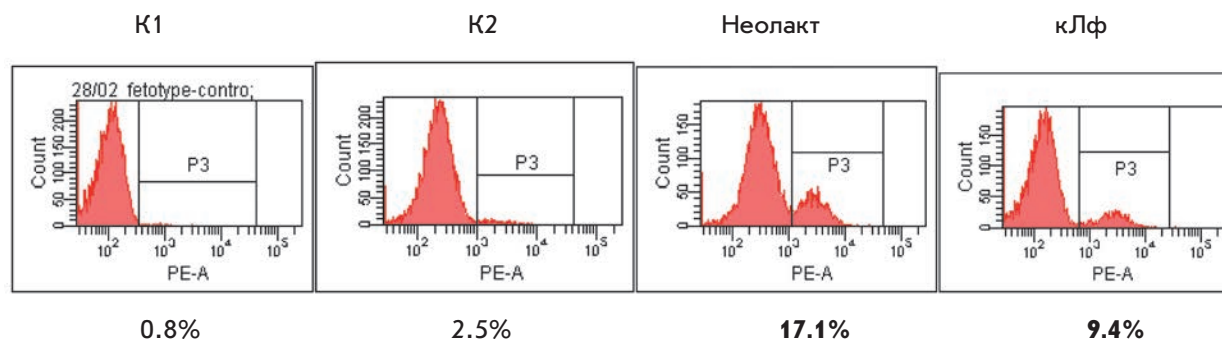


Рис. 3. Влияние Неолакта и козьего лактоферрина на экспрессию молекул CD123 на дендритных клетках линии HTSC.IL-10 в суточных культурах. Гистограммы двуцветного окрашивания моноклональными антителами. К1 – без окрашивания анти-CD123-PE; К2 – без инкубации с Неолактом. Жирным выделены значения, отличающиеся от контроля в 2 и более раз. Концентрации Неолакта и козьего лактоферрина составили 10 мкг / мл

гую костимулирующую молекулу – CD80, исходно представленную на малом числе клеток этой линии. Под влиянием Неолакта фактически происходила смена костимулирующих молекул на поверхности дендритных клеток. При этом под влиянием Неолакта возрастала плотность молекул HLA-DR на каждой индивидуальной клетке. Введение в препарат ионов железа приводило к утрате этих эффектов. Снижение доли дендритных клеток, несущих молекулы HLA-DR, можно рассматривать как свидетельство ограничения под влиянием Неолакта антигенпрезентирующей способности популяции дендритных клеток. Активация Т-клеток, зависящая от экспрессии костимулирующих молекул, в присутствии Неолакта количественно не меняется, поскольку ослабление экспрессии одной костимулирующей молекулы сопровождается усилением экспрессии другой, выполняющей аналогичную функцию. При этом Неолакт обладает активностью фактора дифференцировки дендритных клеток, что регистрируется по экспрессии маркера плазматоидных дендритных клеток – CD123, являющегося рецептором IL-3 (рис. 3). Индукция экспрессии CD123, которую можно трактовать как признак конверсии фенотипа дендритных клеток из миелоидных в плазматоидные [53], определяет иммунный ответа Th2-типа и ослабляет более агрессивный ответ Т-клеток (Th1 и Th17), приводящий к развитию иммунного воспаления. Необходимо отметить, что у кЛф дифференцирующая активность выражена в меньшей степени (рис. 3).

Выбор направления дифференцировки Т-хелперных клеток в конечном счете определяет направление иммунного ответа, а также его про- или противовоспалительный характер, способность благоприятствовать развитию различных форм иммунопатологии

и т.д. Условно к провоспалительным можно отнести Th1- и Th17-клетки, а к противовоспалительным – Th2 и Treg, причем Th2-клетки принято рассматривать как проаллергические. Направление дифференцировки и стабилизация клеточного фенотипа определяются экспрессией факторов транскрипции GATA-3 (для Th2-клеток), Tbet (для Th1), RORc (для Th17) и FOXP3 (для Treg), кодируемых соответственно генами *GATA3*, *TBX21*, *RORC* и *FOXP3*. В связи с этим спектр экспрессии указанных генов Т-клетками крови в значительной степени определяет наследственную или индуцированную склонность организма к развитию иммунного ответа в том или ином направлении, а также различных форм иммунопатологии.

Влияние Неолакта на развитие Т-хелперных клеток различного типа оценивали по их воздействию на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-клеток (таблица). Неолакт и его производное, обогащенное железом, уже в концентрации 1 мкг/мл усиливали экспрессию гена *GATA3*, ответственного за развитие Th2-клеток, антипаразитарную защиту и проаллергическую ориентацию иммунных процессов. Эффект проявлялся при действии Неолакта как на покоящиеся, так и на активированные Т-клетки. Сколь угодно существенного влияния на экспрессию «провоспалительных» генов *TBX21* (кодирует фактор Tbet Th1-клеток) и *RORC* (кодирует фактор Th17-клеток RORc) не обнаружено. Неолакт усиливает экспрессию гена *FOXP3*, ответственного за развитие регуляторных Т-клеток, которые ограничивают интенсивность и длительность иммунного ответа. Неолакт не индуцирует экспрессию в дендритных клетках гена β-цепи IL-12, ответственного за дифференцировку Th1-клеток.

Влияние Неолакта на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов

Неолакт, мкг/мл	Гены факторов транскрипции			
	<i>GATA3</i>	<i>TBX21</i>	<i>RORC</i>	<i>FOXP3</i>
Неактивированные лимфоциты				
0 (контроль)	0.718 (0.527–0.974)	0.010 (0.005–0.018)	0.260 (0.199–0.292)	0.569 (0.306–0.818)
1.0	1.173* (0.815–1.690)	0.014 (0.002–0.016)	0.266 (0.159–0.272)	0.834* (0.811–1.120)
10.0	0.727 (0.481–2.587)	0.018 (0.001–0.028)	0.172 (0.043–0.409)	0.767 (0.246–0.774)
Активированные фитогемагглютинином лимфоциты				
0 (контроль)	0.613 (0.483–0.894)	0.010 (0.005–0.017)	0.649 (0.433–1.013)	0.805 (0.047–1.101)
1.0	1.228* (0.705–1.815)	0.014 (0.007–0.018)	0.487 (0.399–0.802)	1.018 (0.759–2.446)
10.0	0.675 (0.399–0.807)	0.011 (0.008–0.013)	0.743 (0.483–1.576)	0.678 (0.361–1.069)

\**p* < 0.05.

Примечание. Представлены медианы (в скобках – нижний и верхний квартили).

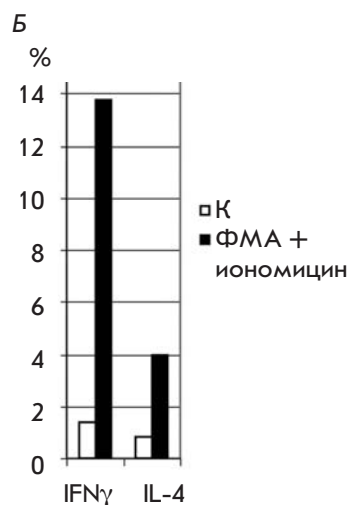
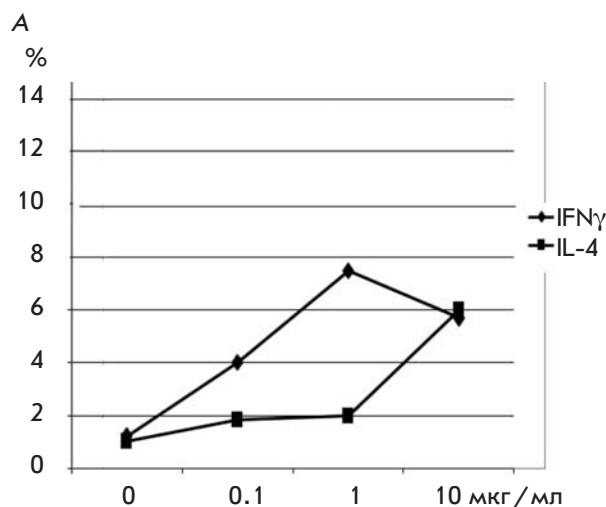


Рис. 4. Влияние Неолакта на индукцию Т-клеток, образующих IFN $\gamma$  и IL-4 (*n* = 3) (А), и положительный контроль синтеза указанных цитокинов Т-клетками при оптимальной стимуляции смесью ФМА/иономицин (100 нМ/2 мкМ соответственно) (Б). По оси абсцисс – концентрация рчЛф (А), по оси ординат – процент клеток, продуцирующих IFN $\gamma$  и IL-4 (А, Б)

Таким образом, в этой группе тестов Неолакт не только не проявил сколько-нибудь выраженной способности усиливать экспрессию факторов, вовлеченных в развитие иммунного воспаления, но оказывал скорее противоположное действие, стимулируя экспрессию генов, ответственных за развитие Th2- и Treg-клеток.

Оценка влияния Неолакта на дифференцировку Th1- и Th2-клеток (Th1- и Th2-клетки определяли по числу клеток, продуцирующих их ключевые

цитокины – IFN $\gamma$  и IL-4 соответственно) показала, что Неолакт усиливает выработку обоих цитокинов. При концентрации 1 мкг/мл продукция IFN $\gamma$  усиливается в большей степени, чем выработка IL-4, при концентрации 10 мкг/мл эффекты обоих цитокинов выравниваются (рис. 4). Но даже при концентрации 1 мкг/мл число клеток-продуцентов IFN $\gamma$  остается существенно меньше, чем при активации клеток смесью ФМА и иономицина, тогда как число IL-4-продуцентов превышает этот уровень. Иными

словами, стимуляция Th2-клеток под действием Неолакта соответствует физиологическому уровню их вовлечения в иммунный ответ, тогда как стимуляция Th1-клеток не достигает этого уровня, что не противоречит результатам оценки влияния рчЛф на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку подклассов Т-хелперных клеток.

## ВЫВОДЫ

Суммируя результаты оценки влияния Неолакта на некоторые проявления активности иммунной системы, можно заключить, что препарат обладает иммуностимулирующей активностью, его действие в определенной степени направлено на сдерживание иммун-

ных процессов или их развитие по Th2-зависимому пути. В то же время, судя по влиянию на формирование IFN $\gamma$ - и IL-4-продуцирующих клеток, препарат не вызывает резко выраженной поляризации иммунного ответа, что могло бы послужить основой для развития аллергических или аутоиммунных процессов. Обогащение препарата ионами железа вызывает усиление его провоспалительной активности и утрату ряда эффектов, свойственных исходному Неолакту. ●

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт № 01.916.12.0001).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Farnaud S., Evans R.W. // Mol. Immunol. 2003. V. 40. P. 395–405.
- Brock J.H. // Biochem. Cell Biol. 2012. V. 90. P. 245–251.
- Sallmann F.R., Baveye-Descamps S., Pattus F., Stivense K.J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 16107–16114.
- van Hooijdonk A.C., Kusstndrager K.D., Steijns J.M. // Br. J. Nutr. 2000. V. 84. P. 127–134.
- Ikeda M., Nozaki A., Sugiyama K., Shiita J., Sato T. // Virus Res. 2000. V. 66. P. 51–63.
- Pietrantonio A., Ammendolia M.G., Superti F. // Biochem. Cell Biol. 2012. V. 90. P. 442–448.
- Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O. // Early Hum. Dev. 2000. V. 59. P. 95–105.
- Giels S., Czuprynski C. // Microb. Pathog. 2002. V. 32. P. 87–97.
- Kruzel M.L., Zimecki M. // Arch. Immunol. Ther. 2002. V. 50. P. 339–410.
- Leitch E.C., Willcox M.D. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2001. V. 18. P. 399–402.
- Naidu A.S., Arnold R.R. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1994. V. 20. P. 69–75.
- Fowler C.E., Soothill J.S., Oakes L. // J. Antimicrob. Chemother. 1997. V. 40. P. 877–879.
- Reiter B. // Ann. Rech. Vet. 1978. V. 9. P. 205–224.
- Petschow B.M., Talbott R.D., Batema R.P. // J. Med. Microbiol. 1999. V. 48. P. 541–546.
- Kim W.S., Ohashi M., Tanaka T., Nozaki A., Sugiyama K. // Biometals. 2004. V. 17. P. 279–283.
- Yamauchi K., Wakabayashi H., Shin K., Takase M. // Biochem. Cell Biol. 2006. V. 84. P. 291–296.
- Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Kuwata H., Yip T.T., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H. // Biochimie. 2009. V. 91. P. 52–57.
- Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A., Stevenson L.M. // Nutr. Res. 2008. V. 28. P. 583–589.
- Kulics J., Kijstra A. // Immunol. Lett. 1986/1987. V. 14. P. 349.
- Furlong S.J., Mader J.S., Hoskin D.W. // Exp. Mol. Pathol. 2010. V. 88. P. 371–375.
- Mader J.S., Salsman J., Conrad D.M., Hoskin D.W. // Mol. Cancer Ther. 2005. V. 4. P. 612–624.
- Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J. // Cancer Res. 1994. V. 54. P. 2310–2312.
- Murphy M.E., Kariwa H., Mizutani T., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I. // Arch. Virol. 2000. V. 145. P. 1571–1582.
- Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. // Успехи совр. биол. 2011. Т. 131. С. 135–144.
- Lonnerdal B., Iyer S. // Annu. Rev. Nutr. 1995. V. 15. P. 93–110.
- Spadaro M., Caorsi C., Ceruti P., Varadhachary A., Forni G., Pericle F., Giovarelli M. // FASEB J. 2008. V. 22. P. 2747–2757.
- Немцова Е.Р., Иванова Л.М., Якубовская Р.И. // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 3. С. 58–61.
- Эделева Н.В., Сергеева Т.В., Немцова Е.Р., Щербицкая И.Я., Якубовская Р.И., Осипова Н.А. // Анестезиология и реаниматология. 2001. Т. 5. С. 61–64.
- Немцова Е.Р., Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Демидова Л.В., Чиссов В.И. // Рос. онкол. журн. 2006. № 4. С. 29–32.
- Эделева Н.В., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Иванова Л.М., Осипова Н.А. // Рос. онкол. журн. 2005. № 6. С. 34–39.
- Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Немцова Е.Р., Сергеева Т.В., Осипова Н.А. Пат. RU № 2165769. 2001.
- Spik G., Burnet B., Mazurier-Dehaine C., Fontaine G., Montreuil J. // Acta Paediatr. Scand. 1982. V. 71. P. 979–985.
- Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G. // J. Antimicrob. Chemother. 2000. V. 46. P. 577–582.
- Valenti P., Berlutti F., Conte M.P., Longhi C., Seganti L. // J. Clin. Gastroenterol. 2004. V. 38. P. 127–129.
- Magnuson J.S., Henry J.F., Yip T.T., Hutchens T.W. // Pediatr. Res. 1990. V. 28. P. 176–181.
- Kawakami H., Lonnerdal B. // Am. J. Physiol. 1991. V. 261. P. 841–846.
- Suzuki Y.A., Shin K., Lonnerdal B. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 15771–15779.
- Baker E.N., Baker H.M. // Cell Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 2531–2539.
- Suzuki Y.A., Lopez V., Lonnerdal B. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 2560–2575.
- Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. // J. Appl. Bacteriol. 1992. V. 73. P. 472–479.
- Odell E.W., Sarra R., Foxworthy M., Chapple D.S., Evans R.W. // FEBS Lett. 1996. V. 382. P. 175–178.



42. Conesa C., Calvo M., Sánchez L. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. P. 831–838.
43. Lönnnerdal B. // *J. Am. Coll. Nutr.* 2002. V. 21. P. 218S–221S.
44. Andersen J.H. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004. V. 6. P. 344–349.
45. van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 484–487.
46. Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A., et al. // *Protein. Expr. Purif.* 2008. V. 57. P. 127–135.
47. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 512–519.
48. Соколов А.В., Пулина М.О., Кристиан А.В., Захарова Е.Т., Рунова О.Л., Васильев В.Б., Гурский Я.Г., Минашкин М.М., Краснов А.Н., Кадулин С.Г. и др. // *ДАН.* 2006. Т. 411. № 2. С. 267–270.
49. Goldman I., Chernousov A., Sadchikova E. // *Recent Adv. Clin. Med.* 2010. P. 315–321.
50. Шарова Н.И., Литвина М.М., Ярилин А.А. // *Иммунология.* 2010. Т. 31. С. 181–185.
51. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. // *J. Immunol. Meth.* 1993. V. 159. P. 197–207.
52. Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. // *Иммунология.* 2011. Т. 32. С. 184–188.
53. Schmitt N., Cumont M.C., Nugeyre M.T., Hurtrel B., Barré-Sinoussi F., Scott-Algara D., Israël N. // *Immunobiology.* 2007. V. 212. P. 167–177.

УДК 612.816

# Управляемый деполяризацией кальций-независимый экзо- и эндоцитоз синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки

М. М. Абдрахманов, А. М. Петров\*, П. Н. Григорьев, А. Л. Зефирова

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бултерова, 49

\*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.04.2013

**РЕФЕРАТ** В экспериментах на кожно-грудинной мышце лягушки с использованием внеклеточного микроэлектродного отведения миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) и флуоресцентной микроскопии (краситель FM1-43) исследовали влияние деполяризации постоянным током мембраны нервных окончаний на секрецию медиатора и процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Показано, что в контроле деполяризация мембраны нервного окончания вызывает выраженное повышение частоты МТКП (секреции квантов медиатора) и экзоцитоза (выгрузка FM1-43 из предварительно загруженных красителем синаптических везикул), которое связано с увеличением внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  при открытии потенциал-зависимых Са-каналов. При блокировании Са-каналов и связывании внутриклеточных ионов  $Ca^{2+}$  (совместное действие ионов  $Cd^{2+}$  и EGTA-AM) деполяризующий ток слабо увеличивал частоту МТКП и экзоцитоз везикул. Процессы эндоцитоза (загрузка FM1-43 во вновь образующиеся синаптические везикулы) как в контроле, так и при совместном действии ионов  $Cd^{2+}$  и EGTA-AM протекали пропорционально количеству синаптических везикул, подвергнувшихся экзоцитозу. Высказано предположение, что в двигательном нервном окончании лягушки кроме Са-зависимого экзо- и эндоцитоза синаптических везикул существует Са-независимый экзо- и эндоцитоз, который может активироваться непосредственно деполяризацией мембраны.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** двигательное нервное окончание, экзоцитоз, эндоцитоз, кальций, постоянный деполяризующий ток, кадмий.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** EGTA-AM – этиленгликоль-бис(β-аминоэтил)-N,N,N',N'-тетраацетоксиметилловый эфир; МТКП – миниатюрные токи концевой пластинки.

## ВВЕДЕНИЕ

Основной функцией пресинаптических нервных окончаний в химическом синапсе является высвобождение порций (квантов) медиатора посредством экзоцитоза синаптических везикул. Экзоцитоз сопровождается процессами эндоцитоза, т.е. образованием новых везикул, которые вновь заполняются медиатором и могут повторно участвовать в освобождении медиатора [1, 2]. Считается, что в естественных условиях процессы экзо- и эндоцитоза активируются за счет повышения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  при открытии потенциал-зависимых Са-каналов плазматической мембраны [3–5].

Са-зависимость вызванного потенциалом действия экзоцитоза синаптических везикул связана со спе-

циализированными белками – синаптотагминами I, II, IX, которые являются основными сенсорами ионов  $Ca^{2+}$  [6]. Спонтанный (асинхронный) экзоцитоз также зависит от  $Ca^{2+}$  и определяется действием внутриклеточного  $Ca^{2+}$  на синаптотагмин I и Doc2b [7, 8]. Влияние ионов  $Ca^{2+}$  на эндоцитоз носит более сложный характер [9, 10]. Повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  может как запускать и ускорять эндоцитоз [11], так и ингибировать его [3, 9]. Регуляция эндоцитоза ионами  $Ca^{2+}$  может опосредоваться кальцинеирином, Са-кальмодулин-зависимой фосфатазой и связыванием  $Ca^{2+}$  с синаптотагмином [12, 13].

Однако существует предположение, что секреция медиатора может контролироваться собственно изменением мембранного потенциала нервного оконча-

ния без входа  $\text{Ca}^{2+}$  [14, 15]. В ганглионарных нейронах деполяризация  $\text{Ca}$ -независимо усиливает экзоцитоз [16], а последующий эндоцитоз не зависит от повышения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и имеет быструю динамику [17].

В представленной работе с использованием электрофизиологического и флуоресцентного методов изучена роль деполяризации в процессах секреции медиатора и экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Объект исследования, растворы

Опыты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы озерных лягушек (*Rana ridibunda*) в зимний (декабрь–февраль) период. Лягушек содержали в холодильнике при температуре  $5^{\circ}\text{C}$  и за 2 ч до опыта переносили в лабораторию. Работа проведена в соответствии с международными правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Использовали стандартный раствор Рингера следующего состава (в мМ): 115.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 2.4  $\text{NaHCO}_3$ ; pH поддерживали на уровне 7.2–7.4, а температуру –  $20^{\circ}\text{C}$ . Все опыты проводили только на поверхностно лежащих нервных окончаниях. Для блокирования потенциала действия нервного окончания в перфузирующий раствор добавляли тетродотоксин в концентрации 1 мкМ. В ряде случаев для блокирования  $\text{Ca}$ -каналов нервного окончания использовали раствор Рингера с добавлением ионов  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 0.2 мМ. Для связывания внутриклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  препарат обрабатывали в течение 1 ч проникающей через мембрану формой кальциевого хелатора EGTA (EGTA-AM) в концентрации 50 мкМ. Все использованные вещества фирмы Sigma (США). Опыты выполнены при постоянной перфузии 5 мл/мин, объем ванночки – 10 мл.

### Электрофизиология

Миниатюрные токи концевой пластинки (МТКП) регистрировали при помощи внеклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором NaCl, с диаметром кончика около 1 мкм и сопротивлением 1–5 МОм. Электрод подводили к нервному окончанию на расстоянии 20–40 мкм от последнего миелинового сегмента. Сигналы усиливались с помощью внеклеточного усилителя и при использовании L-CARD 1250 преобразовывались в цифровую форму. Частоту МТКП определяли по среднему интервалу времени между соседними сигналами (в имп/с).

### Флуоресцентная микроскопия

В экспериментах использовали флуоресцентный краситель FM1-43 (SynaptoGreen C4, Invitrogen, США) в концентрации 6 мкМ. Маркер обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в нервное окончание) [18]. Флуоресценцию наблюдали с помощью CCD-видеокамеры Orca II (Hamamatsu, Япония) и моторизованного микроскопа Olympus BX51 (Германия, программное обеспечение Cell<sup>^</sup>P), оснащенного конфокальной системой DSU и объективом Olympus LUMPLFL 60xw. Анализ свечения терминалей проводили в центральном и дистальном участках нервного окончания. Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах свечения пикселя за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате  $50 \times 50$  пикселей в участке изображения без нервного окончания [19].

### Деполяризация нервного окончания

Для деполяризации нервного окончания использовали две стеклянных микропипетки с диаметром кончиков 2–5 мкм, заполненных 2 М раствором NaCl. Одну (деполяризующую) пипетку под визуальным контролем подводили к претерминальному участку нервного окончания, а вторую – на расстоянии 1 мм от первой к мышечному волокну, на котором располагается нервное окончание. Стимулирующие пипетки подсоединялись к синхронизируемому через компьютер стимулятору DS3 (Digitimer Ltd.), который служил источником тока. Ток в цепи контролировали с помощью микроамперметра.

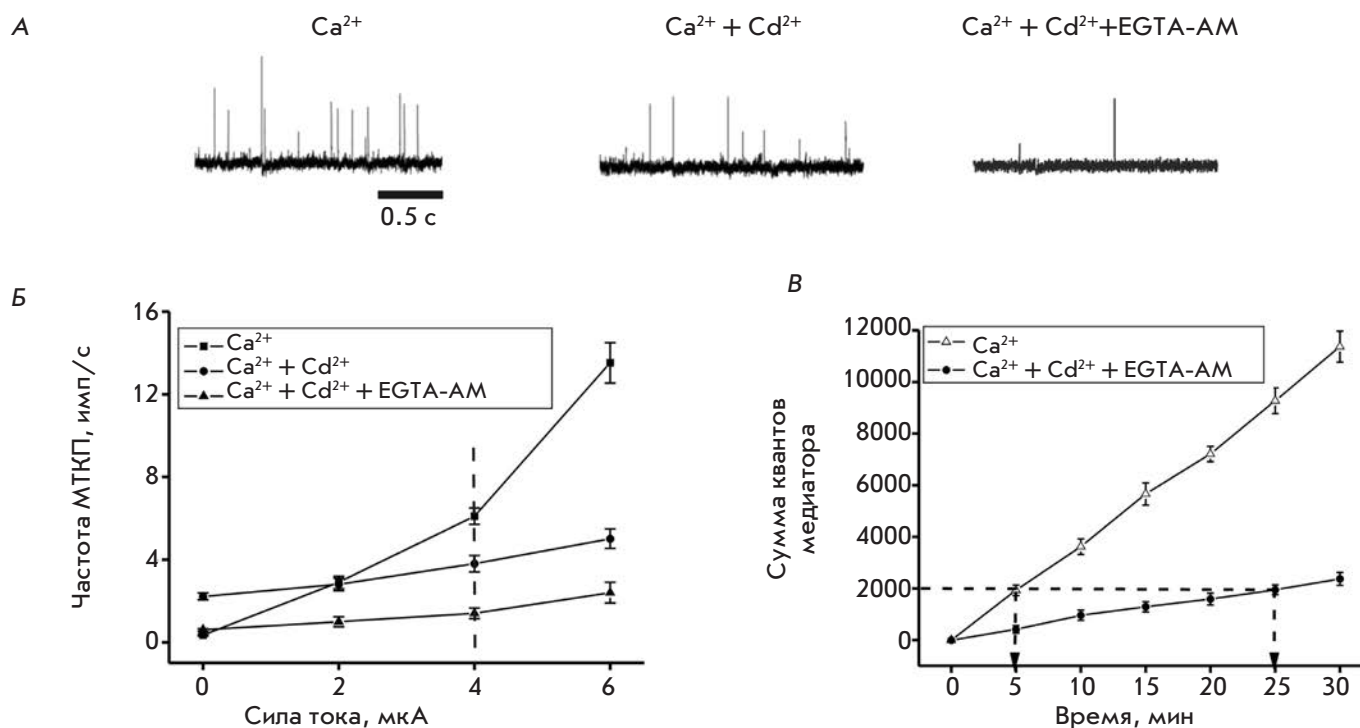
Статистический анализ проводили при помощи программы Origin Pro. Количественные результаты представлены в форме – среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка,  $n$  – число независимых опытов. Статистическую значимость определяли с использованием критериев Стьюдента и ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Электрофизиология. Секреция медиатора при деполяризации нервных окончаний

При внеклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , равной 1.8 мМ, частота МТКП составляла  $0.23 \pm 0.03$  имп/с ( $n = 25$ ). Деполяризация мембраны постоянным током приводила к быстрому увеличению частоты МТКП (рис. 1А), которое сохранялось в течение всего периода пропускания тока (до 40–50 мин). Увеличение частоты МТКП зависело от силы тока (рис. 1Б). Так, при действии постоянного тока силой 2 мкА часто-





**Рис. 1.** Влияние деполяризующего тока на секрецию медиатора. А — изменение частоты МТКП при действии деполяризующего тока (4 мкА) в контроле, в присутствии ионов Cd<sup>2+</sup>, на фоне действия EGTA-AM и Cd<sup>2+</sup>. Б — зависимость частоты МТКП (имп/с) от силы деполяризующего тока (мкА). Штриховой линией указаны значения частоты МТКП при силе деполяризующего тока 4 мкА. В — кумулятивные кривые, иллюстрирующие секрецию медиатора при воздействии деполяризующего тока (4 мкА), с течением времени. По оси ординат — сумма квантов медиатора, по оси абсцисс — время от начала деполяризации. Штриховой линией обозначены координаты точек, соответствующих одинаковой сумме квантов медиатора

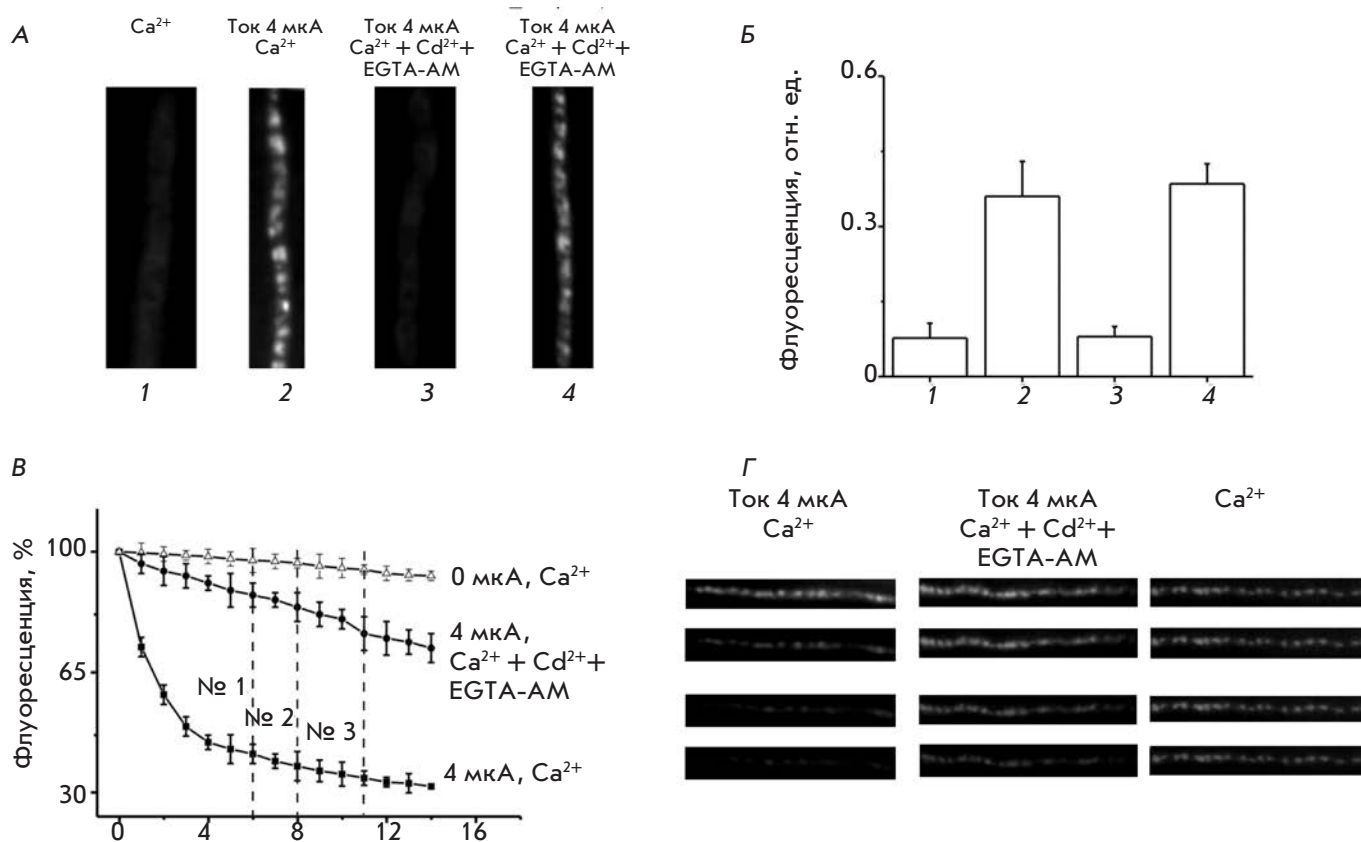
та МТКП увеличивалась до  $2.9 \pm 0.3$  имп/с ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ), а при 4 и 6 мкА — до  $6.1 \pm 0.4$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ) и  $12.9 \pm 0.5$  имп/с ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ) соответственно (рис. 1А,Б).

Добавление в перфузирующий раствор ионов Cd<sup>2+</sup> (0.2 мМ) приводило к увеличению частоты МТКП до  $2.22 \pm 0.04$  имп/с ( $n = 20$ ,  $p < 0.01$ ). При этом эффект деполяризации на частоту МТКП сохранялся, но был менее выражен (рис. 1А,Б). Так, при пропускании деполяризующего тока силой 2, 4 и 6 мкА частота МТКП возрастала до  $2.8 \pm 0.3$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ),  $3.8 \pm 0.4$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ),  $5.2 \pm 0.4$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ) имп/с соответственно (рис. 1А,Б).

Часовая экспозиция в EGTA-AM не изменяла значимо частоту МТКП, которая составляла при этом  $0.20 \pm 0.03$  имп/с ( $n = 16$ ,  $p > 0.05$ ). Предварительная обработка нервно-мышечного препарата EGTA-AM (см. «Экспериментальную часть») приводила к исчезновению стимулирующего эффекта ионов Cd<sup>2+</sup> (0.2 мМ) на частоту МТКП (рис. 1А,Б). Частота МТКП в этих условиях ( $0.21 \pm 0.02$  имп/с ( $n = 20$ ,  $p > 0.05$ ))

не отличалась от контрольных значений. Однако стимулирующий эффект деполяризации на частоту МТКП сохранялся, хотя и был меньше, чем в контроле или на фоне действия Cd<sup>2+</sup> (рис. 1Б). Деполяризующий ток 2, 4 и 6 мкА увеличивал частоту МТКП до  $0.9 \pm 0.2$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ),  $1.5 \pm 0.2$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ),  $2.8 \pm 0.3$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ) имп/с соответственно.

Темп и временной ход секреции медиатора при деполяризации нервного окончания постоянным током мы анализировали с использованием кумулятивных кривых (рис. 1В). В этом случае строили зависимость суммы всех возникших МТКП от времени деполяризации. На рис. 1В представлены кумулятивные кривые секреции медиатора при деполяризации нервного окончания током величиной 4 мкА в течение 30 мин. При 5-минутной деполяризации в контроле из нервных окончаний освобождается примерно столько же квантов медиатора (1800–2000), сколько и при 25-минутной деполяризации нервного окончания, обработанного EGTA-AM, и в присутствии ионов Cd<sup>2+</sup> в окружающей среде (рис. 1В).



**Рис. 2.** Эндоцитоз и экзоцитоз синаптических везикул, вызванный деполяризацией мембраны нервного окончания. **А** – флуоресцентные изображения нервных окончаний, инкубируемых с FM1-43 (25 мин) в покое (1), при деполяризации током в контроле (в течение 5 мин (2)), на фоне действия EGTA-AM и ионов Cd<sup>2+</sup> в течение 5 (3) и 25 мин (4). **Б** – интенсивность флуоресценции нервных окончаний, предварительно инкубируемых с FM1-43 в разных условиях. **В** – динамика снижения яркости флуоресценции нервных окончаний (выгрузки FM1-43) при деполяризации в контроле (4 мкА, Ca<sup>2+</sup>) и на фоне действия EGTA-AM и Cd<sup>2+</sup> (4 мкА, Ca<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup> + EGTA-AM). На графике приведена кривая (0 мкА, Ca<sup>2+</sup>) изменения флуоресценции в покое без деполяризации. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (100% – свечение до действия тока); по оси абсцисс – время действия тока (мин). Штриховыми линиями (№ 1, 2, 3) обозначены значения флуоресценции, соответствующие времени 6, 8 и 11 мин. **Г** – флуоресцентные изображения нервных окончаний, снятые в моменты времени 0, № 1, 2, 3

**Флуоресцентная микроскопия. Деполяризация нервного окончания и процессы эндоцитоза синаптических везикул**

Инкубация нервно-мышечного препарата в стандартном растворе Рингера с FM1-43 (5–40 мин) приводила к появлению неспецифического свечения нервного окончания (рис. 2А) из-за связывания красителя с мембраной [18–20]. При этом средняя интенсивность свечения нервного окончания составила  $0.075 \pm 0.005$  отн. ед. ( $n = 32$ ) (рис. 2Б). При деполяризации нервного окончания в течение 5 мин постоянным током силой 4 мкА в стандартном растворе Рингера с FM1-43 можно было обнаружить интенсивно светящиеся пятна, расположенные вдоль нервного окончания. Эти пятна представ-

ляют собой скопление везикул, прошедших цикл экзоцитоз–эндоцитоз и захвативших флуоресцентный краситель (рис. 2А). В этом случае средняя интенсивность свечения нервного окончания составила  $0.16 \pm 0.01$  отн. ед. ( $n = 27, p < 0.05$ ) (рис. 2Б). При совместном действии EGTA-AM и ионов Cd<sup>2+</sup> и деполяризации мембраны постоянным током силой 4 мкА (5 мин) загрузки красителя в нервное окончание не происходило (неспецифическое свечение нервного окончания  $0.08 \pm 0.004$  отн. ед.,  $n = 30, p > 0.01$ ) (рис. 2А,Б). Однако при более длительном воздействии постоянного тока (25 мин) вдоль нервного окончания появлялись светящиеся пятна ( $0.17 \pm 0.01$  отн. ед.,  $n = 25, p < 0.05$ ), отражающие протекание эндоцитоза (рис. 2А,Б).

### Динамика экзоцитоза синаптических везикул при деполяризации нервных окончаний

Для непосредственной оценки экзоцитоза синаптических везикул мы анализировали динамику уменьшения свечения предварительно загруженных флуоресцентным маркером нервных окончаний [18–20]. Сначала с помощью деполяризации током 4 мкА в течение 5 мин производилась загрузка FM1-43, после периода покоя (1 ч) на окрашенные нервные окончания повторно воздействовали деполяризующим током (4 мкА), вызывающим освобождение красителя (путем экзоцитоза) из синаптических везикул и снижение флуоресценции нервных окончаний (рис. 2В,Г). Следует отметить, что в стандартном растворе Рингера светящиеся пятна сохранялись в течение длительного времени (рис. 2В,Г). На фоне действия постоянного тока (4 мкА) наблюдалось достаточно быстрое и выраженное уменьшение свечения предварительно загруженных нервных окончаний (рис. 2В,Г). К 2 мин деполяризации флуоресценция снижалась до  $58 \pm 3\%$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ), а через 12–15 мин – примерно до 30% от исходного уровня. Если после загрузки красителя препараты выдерживали в EGTA-AM, а потом мембрану нервного окончания подвергали деполяризации постоянным током в присутствии  $\text{Cd}^{2+}$ , то снижение интенсивности флуоресценции нервного окончания (выгрузка) происходило существенно медленнее (рис. 2В,Г). Так, после воздействия тока в течение 2 мин флуоресценция падала до  $95 \pm 2\%$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ ), а по прошествии 12–15 мин светимость пятен сохранялась на уровне примерно 70% от первоначальной.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В большинстве работ по изучению процессов экзо- и эндоцитоза деполяризацию мембраны вызывают с помощью раствора с повышенным содержанием ионов калия [1, 20, 21]. Однако это изменяет равновесный потенциал  $\text{K}^+$  и все сопряженные с транспортом ионов  $\text{K}^+$  процессы (например, работу Na/K-АТФ-азы), а также может ингибировать процессы эндоцитоза синаптических везикул [22]. В нашей работе для оценки роли мембранного потенциала в экзо- и эндоцитозе синаптических везикул мы использовали метод деполяризации мембраны нервного окончания постоянным током, который лишен описанных побочных эффектов.

### Са-независимый экзоцитоз

Проведенные нами исследования показали, что при внеклеточной концентрации ионов кальция, равной 1.8 мМ, деполяризация мембраны нервного окончания постоянным током вызывает увеличение квантовой секреции медиатора (частота МТКП) и до-

статочно быстрой и выраженной выгрузке FM1-43 (рис. 1Б, 2В). Все это свидетельствует о том, что деполяризация мембраны нервного окончания стимулирует экзоцитоз синаптических везикул за счет открытия потенциал-зависимых Са-каналов, входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервные окончания и активации механизма слияния [1, 6, 23].

Следующая задача состояла в оценке значения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в вызванном деполяризацией экзоцитозе синаптических везикул. Для этого можно было попробовать стимулировать деполяризацией экзоцитоз в бескальциевой среде, однако удаление внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  чревато нарушением архитектуры сайтов экзоцитоза, фазового состояния мембраны, структуры мембранных белков и блокирует эндоцитоз синаптических везикул [10, 24]. Поэтому все эксперименты были проведены при нормальной внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ионы  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 0.2 мМ являются эффективными и универсальными блокаторами потенциал-зависимых Са-каналов всех (L-, N-, P/Q-, R-, T-) типов [25]. В двигательных нервных окончаниях холоднокровных обнаружены потенциал-зависимые Са-каналы L-, N-, P/Q- и T-типов [26]. В опытах с применением  $\text{Cd}^{2+}$  показано, что деполяризация вызывает увеличение частоты МТКП, хотя и существенно менее выраженное, чем в контроле (рис. 1Б). Интересно, что сами ионы  $\text{Cd}^{2+}$  вызывают некоторое увеличение секреции медиатора (рис. 1Б), что характерно и для других двухвалентных и трехвалентных катионов [27]. Возможно,  $\text{Cd}^{2+}$  действует на чувствительный к  $\text{Ca}^{2+}$  метаболитный рецептор, активация которого запускает сигнальный каскад, связанный с фосфолипазой С. В результате в нервном окончании образуется диацилглицерин (стимулирующий протеинкиназу С и белок экзоцитоза Munc13) и инозитолтрисфосфат, увеличивающий внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  за счет выхода из эндоплазматического ретикула [28]. Можно предположить, что ионы кадмия проникают внутрь нервного окончания, где стимулируют увеличение цитозольного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  за счет выброса его из депо [29].

Ранее нами было показано, что два буфера, связывающих внутриклеточные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  – EGTA-AM и ВАРТА-AM (1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты тетраацетоксиметиловый эфир), – в одинаковой степени угнетают вызванное гиперкалиевым раствором увеличение частоты МТКП (угнетают увеличение частоты МТКП, вызванное раствором с повышенным содержанием ионов калия), что свидетельствует о схожей эффективности хелатирования ими цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [30]. Для того чтобы убрать описанный

выше эффект  $\text{Cd}^{2+}$ , мы использовали EGTA-AM. Действительно, на фоне хелатирования внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  отсутствовал стимулирующий эффект ионов  $\text{Cd}^{2+}$  на частоту МТКП (рис. 1Б). В то же время на фоне действия EGTA-AM и блокирования входа  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды деполяризующий ток приводил к слабому, но статистически значимому увеличению частоты МТКП (рис. 1Б). В этих условиях с помощью флуоресцентной микроскопии также обнаружена эффективность постоянного тока (4 мкА) в стимулировании экзоцитоза синаптических везикул, что проявлялось в уменьшении свечения предварительно загруженных нервных окончаний (рис. 2В). Все эти наблюдения свидетельствуют о существовании наряду с классическим Са-зависимым экзоцитозом и не зависящего от внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  экзоцитоза синаптических везикул. Гипотетически этот вариант экзоцитоза запускается, вероятно, деполяризацией мембраны во время пресинаптического потенциала действия и является частью вызванной секреции медиатора.

#### Са-независимый эндоцитоз

Процессы экзо- и эндоцитоза тесно связаны и происходят в соотношении один к одному, поэтому оценку интенсивности эндоцитоза нужно проводить при одинаковой интенсивности экзоцитоза. На основе полученных данных мы определили, что при деполяризации в течение 5 мин и силе тока 4 мкА в контроле из нервного окончания освобождается столько же квантов, как и за 30 мин деполяризации нервного окончания, предварительно обработанного EGTA-AM и при одновременном добавлении ионов  $\text{Cd}^{2+}$  в окружающую среду (рис. 1В). Это подтвердили результаты опытов с использованием маркера эндоцитоза FM1-43. В указанных условиях в нервных окончаниях

являлись светящиеся пятна примерно такой же интенсивности, как и в контроле (рис. 2А,Б). Можно предположить, что компенсаторный эндоцитоз может активироваться не только за счет увеличения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при открытии потенциал-зависимых Са-каналов плазматической мембраны [12, 13], но и непосредственно деполяризацией мембраны нервного окончания.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженная зависимость экзоцитоза и эндоцитоза от мембранного потенциала нервного окончания создает дополнительные возможности для регуляции секреции медиатора и синаптической передачи. Молекулярные мишени непосредственного воздействия деполяризации на экзо- и эндоцитоз синаптических везикул не установлены. Но в последних исследованиях потенциал-зависимость обнаруживается у многих сигнальных молекул (протеинкиназ А и С, фосфатазы фосфоинозитидов, сопряженных с G-белками пресинаптических ауторецепторов), воздействующих на механизм экзо- и эндоцитоза синаптических везикул [17, 31–33]. Не исключается также, что сенсором изменения мембранного потенциала являются непосредственно Са-каналы плазматической мембраны, которые могут передавать сигнал о деполяризации на SNARE-комплекс и белки эндоцитоза [14, 34]. ●

Работа поддержана РФФИ  
(гранты № 11-04-00568\_а, 12-04-31550\_мол\_а,  
12-04-33195\_мол\_а\_вед), Минобрнауки РФ  
(НИИ-4670.2012.4, МК-108.2013.4)  
и государственным контрактом  
Минобрнауки РФ (ФЦП).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зефилов А.Л., Петров А.М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо-эндоцитозный везикулярный цикл). Казань: Арт-кафе, 2010. 356 с.
2. Heuser J.E., Reese T.S. // *J. Cell Biol.* 1973. V. 57. № 2. P. 315–344.
3. Зефилов А.Л., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2005. Т. 91. № 7. С. 821–831.
4. Ceccarelli B., Hurlbut W.P. // *J. Cell Biol.* 1980. V. 87. № 1. P. 297–303.
5. Ramaswami M., Krishnan K.S., Kelly R.B. // *Neuron.* 1994. V. 13. № 2. P. 363–375.
6. Pang Z.P., Sudhof T.C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. V. 22. P. 496–505.
7. Xu J., Pang Z.P., Shin O.H., Südhof T.C. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 6. P. 759–766.
8. Groffen A.J., Martens S., Díez Arazola R., Cornelisse L.N., Lozovaya N., de Jong A.P., Goriounova N.A., Habets R.L., Takai Y., Borst J.G., et al. // *Science.* 2010. V. 327. P. 1614–1618.
9. Cousin M.A., Robinson P.J. // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. P. 659–665.
10. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
11. Balaji J., Armbruster M., Ryan T.A. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 6742–6749.
12. Wu X.S., McNeil B.D., Xu J., Fan J., Xue L., Melicoff E., Adachi R., Bai L., Wu L.G. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. P. 1003–1010.
13. Yao J., Kwon S.E., Gaffaney J.D., Dunning F.M., Chapman E.R. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 15. P. 243–249.
14. Parnas H., Segel L., Dudel J., Parnas I. // *Trends Neurosci.* 2000. V. 23. № 2. P. 60–68.
15. Silinsky E.M., Watanabe M., Redman R.S., Qiu R., Hirsh J.K., Hunt J.M., Solsona C.S., Alford S., MacDonald R.C. // *J. Physiol.* 1995. V. 1. № 482. P. 511–520.
16. Zhang C., Zhou Z. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 5. P. 425–430.
17. Zhang C., Xiong W., Zheng H., Wang L., Lu B., Zhou Z. // *Neuron.* 2004. V. 42. № 2. P. 225–236.



18. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron*. 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
19. Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., Giniatullin A.R., Urazaev A.K., Zefirov A.L. // *Neuroscience*. 2011. V. 186. P. 1–12.
20. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология*. 2003. Т. 45. № 12. С. 1163–1171.
21. Ramirez D.M., Kavalali E.T. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 2. P. 275–282.
22. Зефирова А.Л., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н., Петров А.М. // *Цитология*. 2006. Т. 48. № 1. С. 34–41.
23. Angleson J.K., Betz W.J. // *J. Neurophysiol.* 2001. V. 85. № 1. P. 287–294.
24. Зефирова А.Л., Мухамедзянов Р.Д., Минлебаев М.Г., Черанов С.Ю., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2002. Т. 88. С. 191–204.
25. Zheng N., Raman I.M. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 31. P. 9826–9838.
26. Нуруллин Л.Ф., Ценцевицкий А.Н., Маломуж А.И., Никольский Е.Е. // *ДАН*. 2013. Т. 449. № 3. С. 360–363.
27. van der Kloot W., Molgó J. // *Physiol. Rev.* 1994. V. 74. № 4. P. 899–991.
28. Vyleta N.P., Smith S.M. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 12. P. 4593–4606.
29. Braga M.F., Rowan E.G. // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. № 8. P. 1729–1739.
30. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н. // *Бюл. экп. биол. и мед.* 2008. Т. 146. № 12. С. 608–612.
31. Chen X., Zhang X., Jia C., Xu J., Gao H., Zhang G., Du X., Zhang H. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 46. P. 39760–39767.
32. Dekel N., Priest M.F., Parnas H., Parnas I., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 1. P. 285–290.
33. Murata Y., Okamura Y. // *J. Physiol.* 2007. V. 583. P. 875–989.
34. Zheng H., Fan J., Xiong W., Zhang C., Wang X., Liu T., Liu H., Sun L., Wang Y., Zheng L., et al. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. P. 2449–2456.

УДК 576.32/.36:577.113

# Аналоги Alu- и 7SL РНК подавляют жизнеспособность клеток MCF-7, модулируя транскрипцию генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулула

Д. Н. Барякин<sup>1\*</sup>, Д. В. Семенов<sup>1</sup>, А. В. Савельева<sup>1,2</sup>, О. А. Коваль<sup>1</sup>, И. В. Рабинов<sup>1</sup>,  
Е. В. Кулигина<sup>1</sup>, В. А. Рихтер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,  
Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090,  
Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: baryakindn@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.08.2013

**РЕФЕРАТ** Геном человека на 11% состоит из Alu-ретротранспозонов, транскрипция которых РНК-полимеразой III (Pol III) приводит к накоплению от нескольких сотен до тысяч копий Alu-РНК в цитоплазме. Экспрессия Pol III Alu-РНК существенно возрастает при различных стрессах, а повышение уровня Alu-РНК сопровождается подавлением пролиферации, снижением жизнеспособности и индукцией апоптотических процессов в клетках человека. Однако вопрос о биологических функциях Pol III Alu-транскриптов, а также механизм их действия в настоящее время остается открытым. В представленной работе синтезированы аналоги Alu-РНК и ее эволюционного предшественника 7SL РНК. Трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 аналогами Alu-РНК и 7SL РНК сопровождается снижением жизнеспособности и индукцией проапоптотических изменений в этих клетках. Анализ совместного действия этих аналогов и агониста D или тамоксифена показал, что снижение жизнеспособности клеток MCF-7, трансфицированных Alu-РНК и 7SL РНК, обусловлено модуляцией транскрипции. В результате полнотранскриптомного анализа экспрессии генов установлено, что под действием аналогов и Alu-, и 7SL РНК в клетках MCF-7 усиливается экспрессия генов регулятора транскрипции *NUPR1* (p8), а также фактора транскрипции *DDIT3* (CHOP). Сделан вывод, что индукция проапоптотических изменений клеток человека под действием аналогов Alu-РНК и 7SL РНК связана с активацией транскрипции генов факторов клеточного стресса, в том числе факторов ответа на стресс эндоплазматического ретикулула.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** Alu-повторы, Alu-РНК, 7SL РНК, клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат; ЭР – эндоплазматический ретикулум; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид; JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид; SRP (signal recognition particle) – сигналраспознающая частица.

## ВВЕДЕНИЕ

Геном человека на 45% состоит из мобильных элементов, наиболее многочисленные среди которых Alu-повторы  $\sim 1.1 \times 10^6$  копий, что составляет 10.6% ядерной ДНК [1, 2]. Во множестве Alu-повторов приматов выделяют несколько подсемейств, объединенных в три основные группы – AluJ, AluS и AluY [3]. Копийность представителей эволюционно древних AluJ-повторов, появление которых в геноме оце-

нивается примерно в 80 млн лет, и промежуточных подсемейств – AluS (~40 млн лет), в геноме человека не увеличивается. Повторы подсемейства AluY (> 20 млн лет) транспозиционно активны и в настоящее время [4].

Известно, что образование новых копий Alu- и родственных им SINE-повторов в геноме млекопитающих происходит по механизму ретротранспозиции, который включает стадию образования РНК-копий

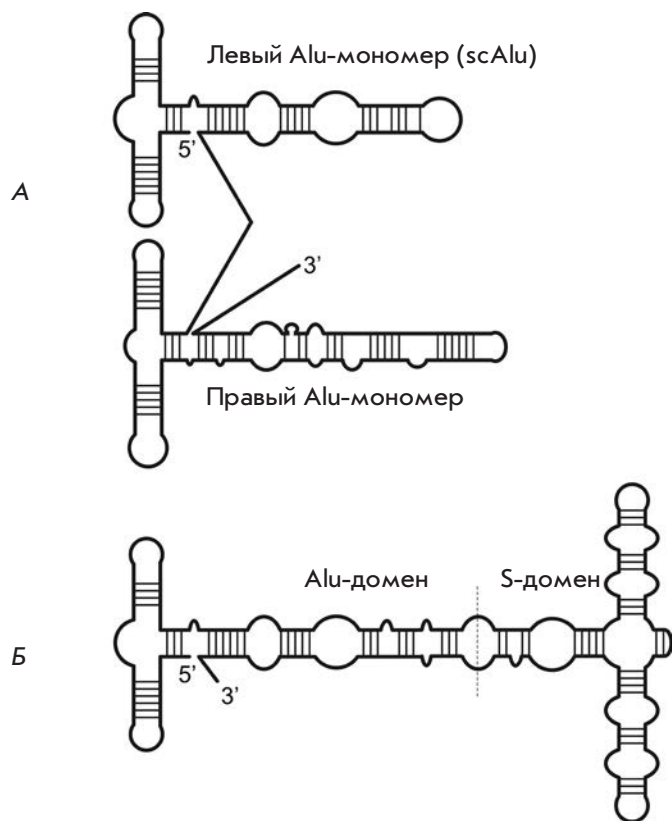


Рис. 1. Схематическое представление вторичной структуры Alu-РНК (А) и 7SL РНК (Б) в соответствии с данными [12]

SINE-ДНК. Эволюционно значимые изменения генома происходят благодаря «успешным» актам ретро-транспозиции повторов в половых клетках [5, 6].

Вместе с тем известно, что как в половых, так и в соматических клетках человека присутствуют РНК-копии геномных Alu-повторов (Alu-РНК) [7]. Alu-РНК синтезируются РНК-полимеразой III (Pol III) [8] и представляют собой набор РНК-копий «древних», транспозиционно неактивных Alu-повторов подсемейств J и S и транспозиционно активных AluY [7, 9, 10]. Alu-РНК, как и их эволюционный предшественник 7SL РНК, синтезируются в ядре, а затем транспортируются в цитоплазму. Часть Alu-транскриптов при этом подвергается 3'-эндонуклеазному процессингу с образованием укороченных форм – scAlu-РНК, представленных «левыми» мономерами Alu (рис. 1А). Наряду с укороченными Alu-транскриптами в клетках обнаруживают и непротранспозированные формы, представленные Alu-РНК, включающей и «левый», и «правый» мономеры, и 3'-концевую поли-А-последовательность (рис. 1А) [10, 11]. Количество полноразмерных

Pol III Alu-транскриптов составляет  $\sim 10^2-10^3$  молекул на клетку. Регуляция экспрессии Alu-РНК в клетках человека отличается от регуляции других Pol III-транскриптов. Так, ингибитор трансляции циклогексимид и тепловой шок увеличивают экспрессию Alu-РНК в большей степени, чем других Pol III-транскриптов, таких, как 7SL, 7SK, 5S и U6 РНК [8]. Постоянное присутствие полноразмерных Alu-транскриптов в цитоплазме, а также увеличение экспрессии этих РНК при стрессе, с одной стороны, указывает на Alu-РНК как на строго контролируемый эндогенный фактор мутагенеза, а с другой, позволяет предположить, что Alu-РНК являются регуляторами жизненно важных клеточных процессов [12].

Ранее К. Sakamoto и соавт. [13] показали, что трансфекция клеток HeLa ДНК-конструкциями, содержащими транскрипционно активные Alu-повторы, а также конструкциями, кодирующими 7SL РНК, вызывает подавление репликации ДНК, ингибирует трансляцию и оказывает антипролиферативное действие. Установлено, что трансфекция клеток НЕК 293 почки эмбриона человека ДНК, кодирующей Alu-повторы, приводит к специфической активации экспрессии репортерных генов, предположительно, за счет прямого ингибирования Alu-РНК дцРНК-активируемой протеинкиназы PKR [14]. Позже показали [15], что активация экспрессии репортерного гена в присутствии Alu-РНК обусловлена уменьшением лаг-периода трансляции новосинтезированных мРНК и не связана с ингибированием PKR. Однако новый молекулярный механизм влияния Alu-РНК на инициацию трансляции новосинтезированных мРНК при этом не был предложен.

J. Häslер и К. Strub предположили, что участие Pol III Alu-транскриптов в клеточных процессах связано с их структурным сходством с 7SL РНК (рис. 1) [12, 16]. Как и 7SL РНК, Alu-РНК взаимодействует с белками сигналраспознающей частицы (SRP) [17, 18]. Способность Alu-РНК модулировать трансляцию объясняют взаимодействием с белками SRP9/14: показано, что Alu-РНК активирует трансляцию, а Alu-РНК в комплексе с SRP9/14 ингибирует трансляцию суммарной мРНК клеток HeLa *in vitro* в экстрактах зародышей пшеницы [16].

В экспериментах *in vitro* показано, что Alu-РНК непосредственно взаимодействует с каталитической субъединицей РНК-полимеразы II (Pol II) человека и подавляет активность комплекса Pol II–TBP–TFIIВ–TFIIF на стадии инициации транскрипции [19, 20]. Эти данные позволили предположить, что Alu-РНК является неспецифическим регулятором транскрипции мРНК в клетках человека [19].

Недавно при изучении молекулярных и клеточных механизмов географической атрофии сетчатки –

одной из основных причин снижения остроты зрения и слепоты у людей старше 50 лет – установлено, что гибель клеток пигментного эпителия сетчатки сопровождается снижением экспрессии гена *DICER1* и накоплением в них Pol III AluSc-транскрипта [21]. При этом показано, что ключевой фермент посттранскрипционного процессинга микроРНК – РНКазы *Dicer1* гидролизует Alu-РНК *in vitro*. Снижение экспрессии *DICER1* приводит к накоплению AluSc-РНК, которая, в свою очередь, подавляет жизнеспособность и вызывает апоптотическую гибель клеток эпителия сетчатки [21]. Предложен молекулярный механизм цитотоксического действия Alu-РНК в клетках пигментированного эпителия, который включает в себя генерацию активных форм кислорода митохондриями, активацию NLRP3-инфламмасом, а также активацию MyD88-сигнального каскада [22]. Таким образом, именно увеличение уровня экспрессии Alu-РНК рассматривается в качестве основной причины гибели клеток при географической атрофии сетчатки. Однако нерешенным остается вопрос о причинах, по которым Alu-РНК вызывает образование активных форм кислорода [21, 22].

В настоящей работе синтезированы аналоги AluYa5-РНК и 7SL РНК и проведен сравнительный анализ их влияния на жизнеспособность и активацию проапоптотических процессов в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Проанализировано также действие на клетки MCF-7 аналогов Alu-РНК и 7SL РНК в сочетании с цитостатиками – ингибиторами репликации, транскрипции, трансляции и клеточного транспорта. Установлено, что проапоптотические процессы, индуцируемые в клетках MCF-7 аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, модулируются тамоксифеном и актиномицином D. Результаты полнотранскриптомного анализа изменения экспрессии генов в клетках, трансфицированных аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, позволяют предложить новый механизм цитотоксического действия этих РНК, основанный на активации генов ответа на стресс ЭР – *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2* и *ASNS*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

В работе использовали: МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид (Sigma, США); Trizol, липофектамин 2000 (Invitrogen, США); Taq-полимеразу, T7-РНК-полимеразу (Fermentas, США); йодид пропидия, индикатор JC-1, стаурополин (Sigma, США); конъюгат аннексина V с ФИТЦ (BD Pharmingen, США); цисплатин («ЛЕНС-Фарм», Россия); циклогексимид, актиномицин D (Appli-

Chem, ФРГ); интерферон  $\alpha$  («Микроген», Россия); метотрексат, монензин (Sigma, США); тамоксифен («Верофарм», Россия); рекомбинантный фактор некроза опухолей  $\alpha$  человека (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск), обратную транскриптазу MoMLV, рибонуклеозидтрифосфаты, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, T4-полинуклеотидкиназу («Биосан», Новосибирск). Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

### Синтез аналогов Alu- и 7SL РНК

Для получения ДНК-матриц – продуктов ПЦР, кодирующих аналоги Alu- и 7SL РНК под промотором РНК-полимеразы фага T7, геномную ДНК клеток MCF-7 амплифицировали со следующими парами праймеров (строчным шрифтом выделен промотор T7-РНК-полимеразы): AluYa5, chr6:104,183,151–104,183,559: 5'-ATTTGATTCGGTTATTTCCAAGA-3', 5'-atgcagctaatacagactcactataggGAGAGTCTCAGCTACAGAATTGAA-3'; 7SL, chr14:50,329,268–50,329,585: 5'-AAGAGACGGGGTCTCGCTAT-3', 5'-atgcagctaatacagactcactataggTTCGCAGCGTCTCCGACC-3'.

ДНК-матрицы очищали с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях. ДНК элюировали из геля в присутствии 100 мМ NaAc и переосаждали 70% этанолом.

Аналоги AluYa5-РНК и 7SL РНК человека синтезировали в буфере, содержащем 40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидина, 2 мМ NTP и 30 ед. акт. РНК-полимеразы фага T7 при 37°C в течение 2 ч. ДНК-матрицы гидролизировали в присутствии 1 ед. акт. ДНКазы I в течение 40 мин при 37°C, а затем ДНКазу инактивировали, выдерживая 15 мин при 65°C.

Очистку аналогов AluYa5-РНК и 7SL РНК проводили на хроматографической системе Миллихром А2 («Эконова», Россия) с переосаждением 70% этанолом в присутствии 100 мМ NaAc. Первичную структуру аналогов подтверждали с помощью обратной транскрипции РНК, амплификации и секвенирования кДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3730XL Genetic Analyser ЦКП СО РАН «Геномика».

### Анализ жизнеспособности клеток MCF-7, трансфицированных аналогами Alu- и 7SL РНК

Клетки аденокарциномы молочной железы человека культивировали в среде IMDM с добавлением 10 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина, 0.25 мкг/мл амфотерицина и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.



Клетки MCF-7 культивировали в 96-луночном планшете до достижения плотности 60–70% моно-слоя. Клетки трансфицировали 1 мкг/мл РНК в комплексе с липофектаминоном по методике производителя (Invitrogen, США) и инкубировали в течение 24 или 72 ч, как указано в подписях к таблицам. В среду добавляли МТТ до конечной концентрации 0.7 мг/мл и инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Среду удаляли, МТТ-формазан растворяли в изопропиловом спирте и определяли оптическую плотность раствора при  $\lambda = 570$  нм с контролем при  $\lambda = 620$  нм на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 (Berthold technologies).

#### Анализ проапоптотических изменений клеток MCF-7 с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки MCF-7, трансфицированные аналогами Alu- и 7SL РНК, и контрольные клетки, инкубированные в среде с липофектаминоном без РНК, трижды промывали PBS, инкубировали в течение 5 мин при 37°C в присутствии 0.1 мг/мл трипсина. Для анализа изменений клеточной мембраны суспензию клеток инкубировали в присутствии 4.5 мкг/мл йодида пропи-дия и конъюгата аннексина V – ФИТЦ по методике производителя (BD Pharmingen, США). Для анализа изменений трансмембранного потенциала митохондрий ( $\delta\Psi$ ) суспензию клеток инкубировали в присутствии 2.5 мкг/мл JC-1. Препараты анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter FC 500 по методу, описанному в работе [23]. В качестве положительного контроля проапоптотических изменений использовали препараты клеток MCF-7, инкубированных 24 ч в присутствии 5 мкг/мл фактора некроза опухолей  $\alpha$  или в присутствии 1 мкМ стауроспорина.

#### Анализ изменений транскриптома клеток MCF-7 на чипах Illumina

Клетки MCF-7 трансфицировали 1 мкг/мл Alu-РНК либо 1 мкг/мл 7SL РНК и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в тех же условиях с липофектаминоном без РНК. Гибридизацию суммарной РНК клеток MCF-7 на чипах HT-12 Illumina проводили на базе ЗАО «Геноаналитика» (Москва). Дифференциальный анализ изменений экспрессии генов проводили с использованием алгоритма Illumina custom с нормированием данных по методу rank invariant. Для интерпретации результатов дифференциального анализа изменений экспрессии генов использовали транскрипты с параметром Detection Pval < 0.05. При интерпретации данных об увеличении экспрессии генов под действием Alu-РНК из рассмотрения исключали транскрип-

ты, структура гибридизационных зондов (Illumina PROBE\_SEQUENCE) для которых содержит прямые последовательности Alu-повторов.

Выборочную верификацию результатов полно-транскриптомного анализа проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием следующих пар праймеров:

*PSPH* – 5'-ATGATTGGAGATGGTGCCAC-3',  
5'-CAGTGATATACCATTTGGCG-3';  
*DDIT3* – 5'-GACCTGCAAGAGGTCTGTGTC-3',  
5'-AAGCAGGGTCAAGAGTGGTG-3';  
*MTHFD* – 5'-TGTAGGACGAATGTGTTTGG-3',  
5'-AACATTTGCAATGGGCATTCC-3';  
*TDP1* – 5'-CTCATCAGTTACTTTGATGGC-3',  
5'-TGACTTCTTTGAAAGCGTCC-3';  
*ZNF682* – 5'-AAGCCAGAACTGATTAGCCG-3',  
5'-AAGGTCTTCAGTGTAATGAG-3';  
*CEBPG* – 5'-CGCTCGGAGTGGAGGCCGCC-3',  
5'-CAGGGTGATCAATGGTTTCC-3'.

В качестве нормировочного контроля использовали мРНК *GAPDH*, *HPRT* [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние аналогов Alu- и 7SL РНК на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

Действие Alu-РНК и ее эволюционного предшественника 7SL РНК на клетки человека анализировали с использованием аналога Alu-РНК – транскрипта геномного повтора человека AluYa5, а также аналога 7SL РНК человека.

Установлено, что трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 аналогами Alu- и 7SL РНК вызывала существенные морфологические изменения: конденсацию цитоплазмы и ядер, разрушение мембранных контактов и открепление клеток от пластиковой подложки. К 72 ч инкубации аналоги Alu- и 7SL РНК вызывали морфологические изменения примерно у 20–30% клеток. При этом инкубация в среде с суммарной РНК MCF-7 или с аналогом фрагмента L1-РНК, или с липофектаминоном без РНК вызывала конденсацию и открепление от подложки не более 5% клеток MCF-7.

Чтобы выяснить, обусловлены ли морфологические изменения, наблюдаемые при воздействии аналогов Alu- и 7SL РНК, антипролиферативными и проапоптотическими процессами, клетки инкубировали с этими аналогами и анализировали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что аналоги Alu-РНК и 7SL РНК вызывают статистически значимое снижение жизнеспособности клеток MCF-7 в условиях трансфекции с липофектаминоном

Таблица 1. Влияние аналогов Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность, асимметрию, проницаемость цитоплазматической мембраны и трансмембранный потенциал митохондрий клеток MCF-7

РНК*	Снижение жизнеспособности (МТТ-индекс $\pm$ SD, %)**	Проапоптотические изменения мембраны***			Трансмембранный потенциал митохондрий $\delta\Psi$ ****, % клеток	
		AnnV-/PI-	AnnV+/PI-	AnnV+/PI+	без диссипации	с диссипацией
		Жизнеспособные клетки, %	Апоптотические тельца, %	Вторичные некротические клетки, %		
7SL РНК	19.0 $\pm$ 4.8	69.2	19.3	11.5	83.4	16.6
Alu-РНК	15.3 $\pm$ 6.5	68.7	13.8	17.5	85.6	14.4
РНК MCF-7	-2.8 $\pm$ 8.2	85.2	7.4	7.3	97.9	2.1
Липофектамин	0 $\pm$ 2.5	89.9	6.8	3.3	99.7	0.3

\*Клетки трансфицировали 1 мкг/мл РНК в комплексе с липофектамином.

\*\*За 100% принимали жизнеспособность клеток, инкубированных в среде с липофектамином без РНК.

\*\*\*Изменения мембраны клеток анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V (AnnV), меченного ФИТЦ, и йодида пропидия (PI).

\*\*\*\*Диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, окрашенных митохондриальным красителем JC-1 [23].

( $p < 0.05$ ). Наблюдаемые морфологические изменения в совокупности со снижением жизнеспособности под действием аналогов Alu- и 7SL РНК указывают на то, что трансфекция этими РНК приводит к проапоптотическим изменениям клеток.

Для того чтобы независимым методом оценить индукцию проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu- и 7SL РНК, мы провели анализ изменений трансмембранного потенциала митохондрий  $\delta\Psi$  с использованием индикатора JC-1. В митохондриях жизнеспособных клеток индикатор JC-1 образует агрегаты со спектром флуоресценции, смещенным в длинноволновую область ( $\lambda_{max} = 590$  нм). Диссипация трансмембранного потенциала митохондрий  $\delta\Psi$  сопровождается сдвигом максимума спектра флуоресценции индикатора в зеленую область ( $\lambda_{max} = 527$  нм). Анализ клеточных препаратов методом проточной цитофлуориметрии в присутствии индикатора JC-1 позволяет оценить относительный вклад популяции клеток с проапоптотическими изменениями мембраны митохондрий [23, 25].

Установлено, что снижение жизнеспособности клеток MCF-7 под действием аналога 7SL РНК сопровождается снижением трансмембранного потенциала  $\delta\Psi$  примерно у 17% клеток (табл. 1). При этом действие 7SL РНК не отличалось от действия аналога Alu-РНК ( $p > 0.05$ ). Таким образом, данные об изменении потенциала митохондрий  $\delta\Psi$  согласуются с результатами анализа жизнеспособности с использованием МТТ-теста и с оценкой глубины морфологических изменений клеток.

Трансфекция клеток аналогами Alu- и 7SL РНК приводит к появлению постклеточных структур, экспонирующих на внешней поверхности фосфатидилсерин, а также структур, мембрана которых проницаема для йодида пропидия – апоптотических и вторичных некротических телец. Суммарный вклад апоптотических и вторичных некротических телец в общую популяцию клеток, трансфицированных аналогом Alu-РНК или аналогом 7SL РНК, составлял около 31% (табл. 1).

Известно, что появление фосфатидилсерина на внешней поверхности цитоплазматической мембраны, детектируемое по окраске аннексином V, является одним из самых ранних биохимических признаков апоптоза [26]. В то же время снижение активности митохондриальных и цитоплазматических оксидоредуктаз и изменение уровня NADH/NADPH, детектируемое с помощью МТТ-теста [27], характерно для поздних стадий апоптоза. Поэтому различия в цитотоксическом действии Alu- и 7SL РНК, оцененные по снижению индекса МТТ (~ 15–19%) и индукции апоптотических процессов по экспозиции фосфатидилсерина и проницаемости цитоплазматической мембраны (~ 31%), можно объяснить большей чувствительностью подхода с использованием системы аннексин V/PI.

В целом эти результаты позволяют заключить, что аналоги и Alu-РНК, и 7SL РНК снижают жизнеспособность и индуцируют проапоптотические изменения в субпопуляции клеток MCF-7, а действие аналогов Alu-РНК несущественно отличалось

Таблица 2. Влияние аналогов Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 в присутствии цитостатиков

Эффектор (IC <sub>40</sub> *)	Alu(+)-РНК		7SL(+)-РНК	
	МТТ-индекс ± SD, %**	p***	МТТ-индекс ± SD, %**	p***
Цисплатин (9.5 мкМ)	25.7 ± 7.7	0.004	20.0 ± 3.5	0.001
Циклогексимид (0.56 мкМ)	17.9 ± 6.7	0.010	14.9 ± 7.5	0.026
Интерферон α (400 МЕ/мл)	17.8 ± 7.6	0.022	26.5 ± 7.9	0.009
Метотрексат (33.3 мкМ)	11.5 ± 10.2	0.171	26.5 ± 8.4	0.011
Монензин (2.5 пМ)	3.8 ± 6.3	0.352	10.8 ± 5.1	0.021
Тамоксифен (450 мкМ)	-1.2 ± 12.7	0.897	-12.1 ± 12.6	0.244
Актиномицин D (5.6 нМ)	21.5 ± 21.2	0.232	-57.7 ± 22.6	0.031

\*Указаны экспериментально подобранные концентрации эффекторов, при которых жизнеспособность клеток снижалась на 40% после инкубации в течение 72 ч (в присутствии липофектамина).

\*\*Дополнительное снижение МТТ-индекса к 72 ч после трансфекции клеток РНК. За 0% принимали жизнеспособность клеток, инкубированных в среде с липофектаминоном, с эффектом в указанной концентрации и без РНК.

\*\*\*Значение *p* для *t*-критерия Стьюдента.

от действия 7SL РНК на уровне изменения активности цитоплазматических и митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест), диссипации трансмембранного потенциала митохондрий  $\delta\Psi$  и по оценке глубины морфологических изменений.

### Влияние Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 в сочетании с цитостатиками

Ключевые процессы, подавление или активация которых происходит при трансфекции клеток аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, мы охарактеризовали по изменению жизнеспособности MCF-7 в условиях совместного действия аналогов и серии цитостатиков (табл. 2). Совместное действие РНК и ингибиторов клеточных процессов анализировали с использованием такой концентрации цитостатиков в культуральной среде, при которой к 72 ч инкубации жизнеспособность клеток MCF-7 снижалась на 40% (IC<sub>40</sub>).

Из данных табл. 2 видно, что трансфекция клеток аналогами Alu-РНК и 7SL РНК усиливает цитотоксическое действие: цисплатина на ~25 и 20%; циклогексимид на ~18 и 15%; интерферона α на ~18 и 27% соответственно (*p* < 0.05). Таким образом, для этого набора эффекторов трансфекция аналогами Alu- и 7SL РНК оказывала однонаправленное и сравнимое по величине действие на клетки MCF-7.

В основе цитотоксического действия цисплатина лежит образование нерепарируемых сшивок ДНК, подавление репликации и митоза [28]. Аддитивность цисплатина и Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 2) прямо указывает на то, что цитотоксическое действие этого

цитостатика и Alu-РНК или 7SL РНК – независимые процессы, а эффекты этих РНК не связаны непосредственно с репликацией ДНК и активацией процессов репарации в клетках MCF-7.

Действие интерферона α основано на рецепторопосредованной активации транскрипции генов, индуцируемых интерфероном, в том числе и гена протеинкиназы PKR. PKR, в свою очередь, активируется при взаимодействии с двухцепочечной РНК или с РНК, содержащей протяженные шпильки, и ингибирует синтез белка в клетке путем фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2 [29]. Поэтому аддитивное действие аналогов Alu- или 7SL РНК и интерферона α, может быть объяснено тем, что эти РНК, обладая развитой вторичной структурой (рис. 1), индуцируют PKR-зависимое подавление трансляции в клетках, обработанных интерфероном α. С другой стороны, активация PKR двухцепочечными РНК служит сигналом к индукции каскадов врожденного иммунного ответа клеток и, как следствие, интерферогенным стимулом [29]. Поэтому PKR-зависимый механизм действия Alu- и 7SL РНК предусматривает многократное усиление действия интерферона α. В то же время и Alu-, и 7SL РНК вызывают аддитивное снижение МТТ-индекса стимулированных интерфероном клеток, сравнимое со снижением жизнеспособности при сочетании Alu- или 7SL РНК с циклогексимидом или с действием самих РНК без интерферона α (табл. 1, 2). Кроме того, ранее в ряде работ было показано, что действие Alu-РНК на различные про-

цессы в клетках млекопитающих не связано непосредственно ни с развитой вторичной структурой этих РНК, ни с активацией PKR [15, 21, 22]. Таким образом, PKR-зависимый механизм действия структурированных РНК, а также интерферогенная активность таких РНК только частично объясняет индукцию проапоптотических процессов Alu- и 7SL РНК в клетках MCF-7.

7SL РНК вызывала значимое снижение МТТ-индекса в сочетании с метотрексатом и монензином ( $p < 0.05$ ), а изменение жизнеспособности клеток при трансфекции Alu-РНК в сочетании с этими цитостатиками не было статистически значимым (табл. 2). При этом снижение МТТ-индекса 7SL РНК в присутствии метотрексата или монензина отличалось от снижения, индуцируемого Alu-РНК в сочетании с этими цитостатиками ( $p < 0.05$ ). Эти данные показывают, что ингибитор дегидрофолатредуктазы – метотрексат, и ионофор – монензин, частично подавляют цитотоксическое действие Alu-РНК, но не 7SL РНК.

В препаратах клеток, инкубированных в среде с тамоксифеном, не наблюдалось дополнительного статистически значимого снижения жизнеспособности ( $p > 0.05$ ) при трансфекции Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 2). Поэтому можно заключить, что тамоксифен частично подавляет цитотоксическое действие и Alu-РНК, и 7SL РНК на клетки MCF-7.

Известно, что тамоксифен ингибирует рецепторы эстрогена, а его действие на клетки MCF-7 обусловлено изменением транскрипции эстрогензависимых генов. Тамоксифен также является эффективным модулятором действия интерферонов. Совместное действие интерферона и тамоксифена синергически снижает жизнеспособность клеток MCF-7 и индуцирует их массовую гибель как в культуре, так и в модели ксенографтов [30, 31]. Поэтому частичное подавление тамоксифеном цитотоксического действия аналогов Alu- и 7SL РНК на клетки MCF-7 подтверждает предположение о том, что влияние этих РНК на жизнеспособность клеток не связано с потенциальными интерферогенными свойствами этих структурированных РНК.

Актиномицин D, ДНК-интеркалятор и ингибитор транскрипции и репликации, полностью подавлял цитотоксическое действие аналога 7SL РНК, а Alu-РНК в сочетании с этим цитостатиком не вызывала дополнительного значимого снижения жизнеспособности (табл. 2). Принимая во внимание, что ингибирование репликации цисплатином не снижало действия Alu- и 7SL РНК, можно заключить, что частичная, в случае с Alu-РНК, и полная, в случае с 7SL РНК, отмена их цитотоксического действия актиномицином D обусловлена влиянием этих РНК

на транскрипцию в клетках человека. Данные о компенсации цитотоксического эффекта Alu- и 7SL РНК модулятором транскрипции тамоксифеном (табл. 2) подтверждают вывод о том, что ключевым элементом механизма действия и Alu-РНК, и ее ближайшего гомолога 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 является модуляция транскрипции ядерной ДНК.

#### **Анализ изменения экспрессии генов в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu- и 7SL РНК**

Гены, экспрессия которых изменяется под действием аналогов Alu- и 7SL РНК, мы выявляли с помощью полнотранскриптомного анализа РНК клеток MCF-7 на микрочипах Illumina HT-12. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в среде с липофектаминоном без РНК.

Установлено, что трансфекция Alu-РНК в клетки MCF-7 приводит к повышению экспрессии 68 транскриптов в 3 раза и более и к понижению экспрессии 87 транскриптов. Трансфекция клеток 7SL РНК повышала в 3 раза и более уровень 45 генов и понижала уровень 74 генов. В группах транскриптов с повышенной экспрессией выявлено 13 транскриптов, общих для Alu- и 7SL РНК, и 25 общих транскриптов обнаружено в группах с пониженной экспрессией. Эти данные показывают, что Alu-РНК и 7SL РНК вызывают изменения различающихся наборов транскриптов и позволяют предположить, что различаются также специфичность влияния, а возможно, и механизмы индукции проапоптотических процессов в клетках человека. Однако детальный анализ изменения экспрессии про- и антиапоптотических факторов позволил выявить ряд ключевых процессов, общих для клеток, трансфицированных как Alu-РНК, так и 7SL РНК.

Из данных, представленных в табл. 3 и 4, видно, что в списке транскриптов, экспрессия которых повышается в наибольшей степени, практически отсутствуют продукты интерферон-индуцируемых генов, таких, как *OAS*, *ISG*, *IFIT* или *STAT1* [32]. Кроме того, анализ GO-аннотаций в группе из 68 транскриптов, индуцируемых Alu-РНК, и в группе 45 транскриптов, индуцируемых 7SL РНК, не выявил статистически значимого ( $p < 10^{-4}$ ) повышения вклада групп генов интерферонового ответа и генов врожденного иммунного ответа (данные не приведены). Эти результаты еще раз подтверждают вывод о том, что индукцию проапоптотических процессов в клетках человека аналогами Alu-РНК и 7SL РНК нельзя объяснить активацией PKR, взаимодействием с TLR-рецепторами или другим механизмом, связанным с интерферогенным действием этих РНК.

Среди генов, экспрессия которых повышается под действием и Alu-РНК, и 7SL РНК (табл. 3, 4),



Таблица 3. Транскрипты клеток MCF-7, уровень которых изменяется под действием аналога Alu-ПНК

Транскрипт*	Идентификатор	Относительное изменение экспрессии**	Краткое описание
Повышение экспрессии			
<i>NUPR1</i>	NM_001042483	5.3	Nuclear protein, transcriptional regulator
<i>PER3</i>	NM_016831	5.1	Period homolog 3 (Drosophila)
<i>TXNIP</i>	NM_006472	4.7	Thioredoxin interacting protein
<i>ASNS</i>	NM_133436	4.5	Asparagine synthetase, transcript variant 1
<i>ZNF773</i>	NM_198542	4.3	Zinc finger protein 773
<i>FAM119A</i>	NM_001127395	4.1	Family with sequence similarity 119, member
<i>ZNF750</i>	NM_024702	4.1	Zinc finger protein 750
<i>PRRT2</i>	NM_145239	4.0	Proline-rich transmembrane protein 2
<i>KCNE4</i>	NM_080671	3.9	Potassium voltage-gated channel
<i>C6ORF48</i>	NM_001040437	3.9	Chromosome 6 open reading frame 48
<i>AUH</i>	NM_001698	3.8	AU RNA binding protein
<i>DDIT3</i>	NM_004083	3.8	DNA-damage-inducible transcript 3
<i>KRT81</i>	NM_002281	3.7	Keratin 81
<i>RNASE4</i>	NM_194430	3.6	Ribonuclease, RNase A family 4
<i>FBXO15</i>	NM_152676	3.6	F-box protein 15
<i>FLJ45244***</i>	NM_207443	3.6	<i>DICER1</i> antisense RNA 1 non-coding RNA
<i>MTHFD2</i>	NM_001040409	3.5	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
Понижение экспрессии			
<i>FOXRED2</i>	NM_024955	0.15	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
<i>PPRC1</i>	NM_015062	0.19	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1
<i>CHP</i>	NM_007236	0.21	Calcium binding protein P22
<i>PHLDA2</i>	NM_003311	0.21	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2
<i>TMEM158</i>	NM_015444	0.21	Transmembrane protein 158
<i>ATN1</i>	NM_001007026	0.22	Atrophin 1 (ATN1)
<i>DLK2</i>	NM_206539	0.23	Delta-like 2 homolog (Drosophila)
<i>HPS1</i>	NM_182639	0.23	Hermansky-Pudlak syndrome 1
<i>TMEM214</i>	NM_017727	0.23	Transmembrane protein 214
<i>MED24</i>	NM_014815	0.24	Mediator complex subunit 24
<i>PLEC1</i>	NM_000445	0.24	Plectin 1, intermediate filament binding protein 500 kDa
<i>ZYX</i>	NM_003461	0.24	Zyxin
<i>ACD</i>	NM_022914	0.25	Adrenocortical dysplasia homolog (mouse)
<i>PCDH7</i>	NM_002589	0.25	Protocadherin 7 (PCDH7)
<i>RDH10</i>	NM_172037	0.25	Retinol dehydrogenase 10 (all-trans)
<i>GPX2</i>	NM_002083	0.26	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)

\*Приведены транскрипты, аннотированные в базе данных RefSeq (accessions NM, NR). Серым выделены транскрипты, экспрессия которых изменилась под действием и Alu-ПНК, и 7SL ПНК.

\*\*Изменение количества транскрипта в клетках, обработанных Alu-ПНК, относительно контрольных клеток, обработанных липофектаминол.

\*\*\*Последовательность зонда HT-12 Illumina для гена *FLJ45244* совпадает с последовательностью *DICER-AS1* (NR\_015415).

Таблица 4. Транскрипты клеток MCF-7, уровень которых изменяется под действием аналога 7SL РНК

Транскрипт*	Идентификатор	Относительное изменение экспрессии**	Краткое описание
Повышение экспрессии			
<i>NUPR1</i>	NM_001042483	4.5	Nuclear protein, transcriptional regulator
<i>TXNIP</i>	NM_006472	4.3	Thioredoxin interacting protein
<i>PRRT2</i>	NM_145239	4.3	Proline-rich transmembrane protein 2
<i>PSPH</i>	NM_004577	4.2	Phosphoserine phosphatase
<i>ASNS</i>	NM_133436	3.8	Asparagine synthetase, transcript variant 1
<i>KY</i>	NM_178554	3.8	Кыphoscoliosis peptidase
<i>FABP6</i>	NM_001445	3.7	Fatty acid binding protein 6, ileal
<i>DDIT3</i>	NM_004083	3.6	DNA-damage-inducible transcript 3
<i>CTSK</i>	NM_000396	3.6	Cathepsin K
<i>KRT81</i>	NM_002281	3.6	Keratin 81
<i>PFAAP5</i>	NM_014887	3.4	Phosphonoformate immuno-associated protein 5
<i>NT5E</i>	NM_002526	3.4	5'-Nucleotidase, ecto (CD73)
<i>ARL3</i>	NM_004311	3.4	ADP-ribosylation factor-like 3
<i>ULBP1</i>	NM_025218	3.4	UL16 binding protein 1
<i>BACE2</i>	NM_138992	3.4	Beta-site APP-cleaving enzyme 2
<i>RNASE4</i>	NM_194431	3.3	Ribonuclease, RNase A family 4
Понижение экспрессии			
<i>FOXRED2</i>	NM_024955	0.16	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
<i>GPX2</i>	NM_002083	0.16	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
<i>TUBB2A</i>	NM_001069	0.17	Tubulin, beta 2A
<i>PLEC1</i>	NM_000445	0.19	Plectin 1, intermediate filament binding protein
<i>ZC3HAV1</i>	NM_024625	0.20	Zinc finger CCCH-type, antiviral 1
<i>SLC35C1</i>	NM_018389	0.21	Solute carrier family 35, member C1
<i>NCOR2</i>	NM_001077261	0.21	Nuclear receptor co-repressor 2
<i>PIGW</i>	NM_178517	0.22	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W
<i>MUC1</i>	NM_001044391	0.22	Mucin 1, cell surface associated
<i>OPA3</i>	NM_025136	0.23	Optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia)
<i>PDPK1</i>	NM_002613	0.23	3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1
<i>SLC29A3</i>	NM_018344	0.23	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3
<i>HCFC1</i>	NM_005334	0.24	Host cell factor C1 (VP16-accessory protein)
<i>FAHD1</i>	NM_001018104	0.24	Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1 (FAHD1)
<i>PARP12</i>	NM_022750	0.24	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
<i>LRRC14</i>	NM_014665	0.25	Leucine rich repeat containing 14

\*Приведены транскрипты, аннотированные в базе данных RefSeq (accessions NM, NR). Серым выделены транскрипты, экспрессия которых изменилась под действием и Alu-РНК, и 7SL РНК.

\*\*Изменение количества транскрипта в клетках, обработанных Alu-РНК, относительно контрольных клеток, обработанных липофектаминол.

выделяется *NUPR1*. Известно, что экспрессия гена транскрипционного регулятора *NUPR1* (кодирует белок p8) усиливается в ответ на различные стрессовые воздействия и вызывает устойчивость клеток к химиотерапевтическим средствам, а снижение экспрессии *NUPR1* сопровождается подавлением роста раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [33, 34]. Однако повышение уровня мРНК *NUPR1* сопровождается и апоптотические изменения раковых клеток [35].

Продукт гена *DDIT3* – фактор транскрипции *CHOP* – ключевой медиатор клеточной гибели в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума. Повышение экспрессии этого гена или микроинъекции белка *CHOP* вызывают диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий ( $\delta\Psi$ ), генерацию активных форм кислорода и апоптотическую гибель клетки (детально рассмотрено в обзоре [36]). Поэтому наблюдаемое повышение экспрессии гена *DDIT3* в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu- и 7SL РНК (табл. 3, 4) является существенным проапоптотическим стимулом. Повышение экспрессии *DDIT3* (*CHOP*) и индукция апоптоза в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума могут вызываться непосредственно активацией гена *NUPR1* (p8), как показано в случае индуцируемого канбиноидами апоптоза клеток астроцитомы U87MG [35].

Необходимо отметить, что повышение уровня мРНК *DDIT3*, а также мРНК *PSPH* и *MTHFD2* в клетках MCF-7 под действием Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 3, 4) подтверждено при выборочной проверке результатов полнотранскриптомного анализа независимым методом ОТ-ПЦР (данные не иллюстрированы).

Экспрессия гена *FOXRED2* понижается под действием и Alu-, и 7SL РНК (табл. 3, 4). Продукт гена *FOXRED2*, флавопротеин ERFAD, участвует в перемещении белков из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму. Снижение экспрессии этого гена связывают с активацией протеотоксического стресса эндоплазматического ретикулума [37]. Еще один признак активации ответа на стресс эндоплазматического ретикулума – повышение экспрессии гена аспарагинсинтетазы *ASNS*, транскрипция которого активируется ССААТ/энхансерсвязывающим белком *CHOP* [38].

Таким образом, снижение экспрессии *FOXRED2*, наблюдаемое одновременно с повышением уровня *NUPR1* (p8), *DDIT3* (*CHOP*) и *ASNS*, позволяет заключить, что индукция проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu- и 7SL РНК связана с модуляцией транскрипции ключевых клеточных факторов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

Недавно был предложен новый механизм развития географической атрофии сетчатки, основанный

на снижении экспрессии *DICER1* в клетках эпителия, который приводит к усилению экспрессии Alu-РНК [21]. Субретинальная трансфекция клеток конструкцией, кодирующей 7SL РНК, а также аналогом 7SL РНК не приводила к дегенерации пигментного эпителия сетчатки мыши, в отличие от трансфекции Alu-РНК [21, 22]. Высказано предположение, что цитотоксическое действие Alu-РНК на клетки пигментного эпителия сетчатки связано с неустановленными свойствами Alu-РНК, а механизм действия – с генерацией активных форм кислорода митохондриями [22].

Полученные нами данные показывают, что и Alu-, и 7SL РНК вызывают сравнимые изменения трансмембранного потенциала митохондрий клеток MCF-7 (табл. 1). Следовательно, по крайней мере в клетках MCF-7, и Alu-, и 7SL РНК индуцируют близкие по глубине изменения мембраны митохондрий. При анализе влияния Alu- и 7SL РНК в сочетании

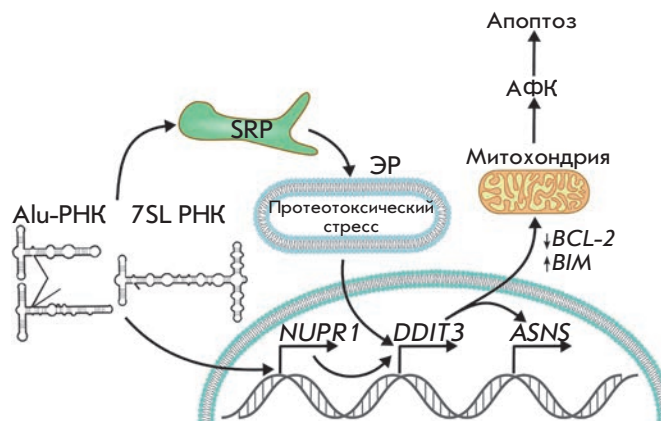


Рис. 2. Схема предполагаемого механизма индукции проапоптотических процессов в клетках MCF-7, трансфицированных аналогами Alu- и 7SL РНК. Трансфекция клеток аналогами Alu- и 7SL РНК сопровождается увеличением экспрессии гена регулятора транскрипции *NUPR1* (p8), который активирует транскрипцию *DDIT3* (*CHOP*) [35]. Увеличение экспрессии фактора транскрипции *DDIT3* вызывает апоптотические изменения внешней мембраны митохондрий по механизму, включающему понижение транскрипции *BCL-2* и активацию транскрипции *BIM*. Апоптоз, индуцируемый *CHOP* (*DDIT3*), сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) [36]. Увеличение экспрессии *DDIT3* может происходить в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, вызванного взаимодействием аналогов Alu- и 7SL РНК с белками SRP, – нарушением транспорта белков через мембрану ЭР. Стресс эндоплазматического ретикулума сопровождается повышением экспрессии гена аспарагинсинтетазы (*ASNS*), транскрипция которого активируется *CHOP* [38]

с актиномицином D и тамоксифеном на жизнеспособность клеток MCF-7 установлено, что цитотоксическое действие этих РНК обусловлено модуляцией транскрипции. Данные об изменении экспрессии генов (табл. 3, 4) показывают, что трансфекция клеток аналогами Alu-РНК или 7SL РНК сопровождается не только неспецифическим ответом на экзогенную РНК – увеличением уровня мРНК рибонуклеазы *RNASE4* и 5'-эктонклеотидазы *NT5E*, но и появлением проапоптотических стимулов: *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2*. При этом экспрессия гена *NUPR1* индуцируется в ответ на широкий спектр стрессовых воздействий, а *DDIT3* и *FOXRED2* специфически связаны с ответом на стресс эндоплазматического ретикулума. Продукт гена *DDIT3* – белок СНОР, является ключевым индуктором апоптоза в ответ на протеотоксический стресс ЭР. Полученные нами данные позволяют предложить механизм проапоптотического действия Alu- и 7SL РНК, который включает в себя активацию транскрипции *NUPR1* (p8) и проапоптотического гена *DDIT3*, продукт которого СНОР индуцирует апоптоз по митохондриальному пути в субпопуляции клеток MCF-7 (рис. 2).

Поскольку 7SL РНК является компонентом сигналраспознающей частицы, а Alu-РНК способна взаимодействовать с белками SRP9/14, можно предположить, что активация аналогами Alu- и 7SL РНК ответа на стресс эндоплазматического ретикулума обусловлена нарушением функционирования именно этого компонента трансляционного аппарата клеток человека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было установлено, что увеличение экспрессии Alu-РНК в клетках человека вызывает подавление репликации ДНК, ингибирует трансляцию и оказывает антипролиферативное действие. Полученные нами данные указывают на то, что ключевой процесс, опосредующий снижение жизнеспособности клеток аденокарциномы человека MCF-7 под действием аналогов как Alu-РНК, так и 7SL РНК, – транскрипция ядерной ДНК. При этом не происходит активации экспрессии интерферон-индуцибельных генов. В то же время трансфекция клеток MCF-7 Alu-РНК или 7SL РНК сопровождается изменением экспрессии ряда генов, в том числе *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2* и *ASNS*. Известно, что изменение транскрипции этих генов ассоциировано с комплексным ответом клетки на стресс ЭР, который способен индуцировать образование активных форм кислорода и гибель клетки по митохондриальному пути апоптоза. Предположительно активация ответа на стресс ЭР под действием аналогов Alu- и 7SL РНК связана с нарушением функционирования в клетках SRP.

В целом полученные нами результаты, а также опубликованные данные показывают, что Alu-РНК является не только маркером, но и медиатором сигналов клеточного стресса. ●

*Работа поддержана РФФИ (грант № 13-04-01058), междисциплинарным интеграционным проектом Президиума СО РАН № 84 (2012–2014 гг.).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Human Genome Sequencing Consortium // *Nature*. 2001. V. 409. № 6822. P. 860–921.
2. Deininger P.L., Batzer M.A. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 10. P. 1455–1465.
3. Batzer M.A., Deininger P.L., Hellmann-Blumberg U., Jurka J., Labuda D., Rubin C.M., Schmid C.W., Zietkiewicz E., Zuckerkandl E. // *J. Mol. Evol.* 1996. V. 42. № 1. P. 3–6.
4. Jurka J., Krnjajic M., Kapitonov V.V., Stenger J.E., Kokhanyu O. // *Theor. Popul. Biol.* 2002. V. 61. № 4. P. 519–530.
5. Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. // *Nat. Genet.* 2003. V. 35. № 1. P. 41–48.
6. Batzer M.A., Deininger P.L. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 5. P. 370–379.
7. Liu W.M., Maraia R.J., Rubin C.M., Schmid C.W. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. № 6. P. 1087–1095.
8. Liu W.M., Chu W.M., Choudary P.V., Schmid C.W. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. № 10. P. 1758–1765.
9. Shaikh T.H., Roy A.M., Kim J., Batzer M.A., Deininger P.L. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 271. № 2. P. 222–234.
10. Maraia R.J., Driscoll C.T., Bilyeu T., Hsu K., Darlington G.J. // *Mol. Cell Biol.* 1993. V. 13. № 7. P. 4233–4241.
11. Sarrova J., Chang D.Y., Maraia R.J. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 3. P. 1144–1151.
12. Häslér J., Strub K. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 19. P. 5491–5497.
13. Sakamoto K., Fordis C.M., Corsico C.D., Howard T.H., Howard B.H. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 5. P. 3031–3038.
14. Chu W.M., Ballard R., Carpick B.W., Williams B.R., Schmid C.W. // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18. № 1. P. 58–68.
15. Rubin C.M., Kimura R.H., Schmid C.W. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 14. P. 3253–3261.
16. Hasler J., Strub K. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 8. P. 2374–2385.
17. Bovia F., Wolff N., Ryser S., Strub K. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 2. P. 318–326.
18. Chang D.Y., Hsu K., Maraia R.J. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. № 21. P. 4165–4170.
19. Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A., Drullinger L.F., Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. № 4. P. 499–509.
20. Yakovchuk P., Goodrich J.A., Kugel J.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 14. P. 5569–5574.
21. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., Fowler B.J., Cho W.G., Kleinman M.E., Ponicsan S.L., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7338. P. 325–330.
22. Tarallo V., Hirano Y., Gelfand B.D., Dridi S., Kerur N., Kim Y., Cho W.G., Kaneko H., Fowler B.J., Bogdanovich S., et al. // *Cell*. 2012. V. 149. № 4. P. 847–859.
23. Galluzzi L., Vitale I., Kepp O., Seror C., Hangen E., Perfettini J.L., Modjtahedi N., Kroemer G. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 442. P. 355–374.



24. Stepanov G.A., Semenov D.V., Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Koval O.A., Rabinov I.V., Richter V.A. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. ID 656158.
25. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. № 1. P. 99–163.
26. Demchenko A.P. // *Exp. Oncol.* 2012. V. 34. № 3. P. 263–268.
27. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005. V. 11. P. 127–152.
28. Siddik Z.H. // *Oncogene.* 2003. V. 22. № 47. P. 7265–7279.
29. Balachandran S., Barber G.N. // *Meth. Mol. Biol.* 2007. V. 383. P. 277–301.
30. Lindner D.J., Kolla V., Kalvakolanu D.V., Borden E.C. // *Mol. Cell Biochem.* 1997. V. 167. № 1–2. P. 169–177.
31. Iacopino F., Robustelli della Cuna G., Sica G. // *Int. J. Cancer.* 1997. V. 71. № 6. P. 1103–1108.
32. Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 26. P. 15623–15628.
33. Goruppi S., Iovanna J.L. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 3. P. 1577–1581.
34. Guo X., Wang W., Hu J., Feng K., Pan Y., Zhang L., Feng Y. // *Anat. Rec. (Hoboken).* 2012. V. 295. № 12. P. 2114–2121.
35. Carracedo A., Lorente M., Egia A., Blázquez C., García S., Giroux V., Malicet C., Villuendas R., Gironella M., González-Feria L., et al. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. № 4. P. 301–312.
36. Tabas I., Ron D. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. № 3. P. 184–190.
37. Riemer J., Appenzeller-Herzog C., Johansson L., Bodenmiller B., Hartmann-Petersen R., Ellgaard L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 35. P. 14831–14836.
38. Siu F., Chen C., Zhong C., Kilberg M.S. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 51. P. 48100–48107.

УДК 571.27

# Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования

Я. А. Ломакин<sup>1#\*</sup>, М. Ю. Захарова<sup>1#</sup>, А. А. Белогуров<sup>1,2</sup>, Н. А. Быкова<sup>3,4</sup>, М. А. Дронина<sup>1</sup>, А. Е. Тупикин<sup>5,6</sup>, В. Д. Кнорре<sup>1</sup>, А. Н. Бойко<sup>7,8</sup>, А. В. Фаворов<sup>9,10,11</sup>, М. Р. Кабилов<sup>5,6</sup>, Н. А. Пономаренко<sup>1</sup>, А. Г. Габибов<sup>1,2,12</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

<sup>3</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127994, Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1

<sup>4</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

<sup>5</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

<sup>6</sup>Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

<sup>7</sup>Московский городской центр рассеянного склероза при городском госпитале № 11, 127018, Москва, ул. Двинцев, 6

<sup>8</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>9</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>10</sup>Факультет онкологии, отдел биостатистики и биоинформатики, Школа медицины при Университете Джона Хопкинса, 21218, Балтимор, Мэриленд, США

<sup>11</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

<sup>12</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

# Авторы внесли равный вклад в данную работу.

\*E-mail: yasha.l@bk.ru

Поступила в редакцию 01.09.2013

**РЕФЕРАТ** Рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, поражающее в основном людей молодого и среднего возраста. На сегодняшний день можно с уверенностью сказать, что без активации В-клеточного ответа развитие данной патологии невозможно. Хотя точный механизм, лежащий в основе этиологии РС, неизвестен, многие ученые полагают, что при определенном сочетании генетических и экологических факторов индуктором заболевания может служить вирусная или бактериальная инфекция. В данной работе мы поставили своей задачей с помощью сочетания методов широкомасштабного секвенирования и функционального отбора охарактеризовать поли- и кроссреактивные антитела, способные одновременно узнавать вирусные белки и аутоантигены, инициируя таким образом развитие болезни путем механизма молекулярной мимикрии. Мы обнаружили, что кроссреактивное узнавание двух антигенов, вероятно, обусловлено сочетанием индивидуального узна-

вания легкой и тяжелой цепью своего конкретного антигена. Выявленная высокая структурная гомология исследованных аутоантител с различными противовирусными антителами позволила нам предположить, что в индукции РС главенствующая роль может принадлежать целому ряду патогенов, а не какому-то определенному вирусу.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аутореактивные В-клетки, вирусные триггеры, кроссреактивность, основной белок миеллина, рассеянный склероз, широкомасштабное секвенирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ИФА – иммуноферментный анализ; МОГ – миелин-олигодендрогликовит; ОБМ – основной белок миеллина; ЛМР-1 (latent membrane protein 1) – латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна–Барр; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость.

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, поражающее с частотой 3 : 10000 в основном людей молодого и среднего возраста. В мире насчитывается более 2.5 млн больных РС [1]. Таким образом, РС является наиболее распространенной демиелинизирующей невроинфламаторной патологией, при которой по пока непонятным причинам иммунная система организма начинает разрушать собственные миелиновые оболочки аксонов [2]. Социальный и экономический факторы имеют огромное значение при этом заболевании вследствие тяжелых симптомов, включающих неврит зрительного нерва, потерю контроля функций кишечника и мочевого пузыря, тяжелые параличи, а также большую длительность хронического периода. В 80% случаев развитие заболевания начинается с рецидивно-ремиттирующего течения, которое со временем переходит во вторично-прогрессирующее. Значительно реже, в 20% случаев, РС сразу же принимает первично-прогрессирующую форму [3].

Несмотря на огромное количество работ, посвященных изучению этиологии РС, точная причина развития или потенциальный патоген, способный индуцировать заболевание, остаются неизвестными. Считается, что для развития РС необходимо наличие предрасположенности, т.е. лишь при определенном сочетании генетических и экзогенных факторов возможна хроническая активация иммунных клеток, приводящая к нейрональным повреждениям. Генетический скрининг выявил несколько генов-кандидатов, среди которых наиболее значимым считается локус *HLA* (human leukocyte antigen) как регион, в наибольшей степени ассоциированный с РС. К сожалению, и здесь не удалось выявить однозначных корреляций, так, например, в Северной Европе исторически выявлена связь развития заболевания с *HLA-DR2* или *HLA-DRB1\*15* [4, 5], а в другой части Европы (например, Сардиния) наибольшую ассоциацию проявили *HLA-DRB1\*0301*, *HLA-DRB1\*0405* и *HLA-DRB1\*1303* [6]. Согласно другим данным,

обнаружены и новые гаплотипы (*HLA-DRB1\*03*, *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*10*, *HLA-DRB1\*11*, *HLA-DRB1\*14* и *HLA-DRB1\*08*), коррелирующие с патологией как отрицательно, так и положительно, но при этом сила эффекта варьировала от случая к случаю [7–10]. Тем не менее однозначно установлено увеличение риска развития РС у родственников больного [11–14], при этом у ближайших родственников риск повышен примерно в 10–25 раз по сравнению с обычной популяционной выборкой. Также выявлена и связь гена *CD40* (rs6074022) с РС [15]. Доказательством генетической предрасположенности может служить и значительная генетическая детерминированность индивидуального ответа больных на лечение многими препаратами. Например, фармакогеномные исследования РС обнаружили значимую роль ряда полиморфных вариантов генов (*CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFB1*, *IFNAR1*, *IL7RA*, а также, возможно, *TNF* и *CTLA4*) в формировании ответа на прием копаксона [16]. Эпидемиологические исследования, в свою очередь, выявили несколько факторов риска РС, включая бактериальные и вирусные инфекции, климатические условия и курение.

Хотя исходная причина, вызывающая РС, остается неизвестной, при этом заболевании всегда происходят сходные процессы, такие, как активация и увеличение количества иммунных клеток в ЦНС, что в дальнейшем приводит к демиелинизации, аксональному/нейрональному повреждению и гибели олигодендроцитов – знаковым симптомам РС [17]. Если на начальных этапах изучения РС основную роль в развитии заболевания отводили Т-лимфоцитам, то сейчас можно уверенно сказать, что для развития патологии необходима активация В-клеток. В-лимфоциты не только продуцируют патогенные аутоантитела, но и являются активными антигенпрезентирующими (АПК) и цитокинпродуцирующими клетками [18]. Список потенциальных аутоантигенов при РС постоянно расширяется и включает в себя различные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Среди них особо выделяют основной белок миели-

на (ОБМ), протеолипидный белок (PLP1) и миелинолигодендроцитарный гликопротеин (МОГ). Причем в сыворотке больных РС, а также мышей линии SJL с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом – моделью РС, обнаружены даже каталитические антитела к ОБМ, которые не только связывают, но и гидролизуют его [19–21].

Таким образом, выявление чужеродного, к примеру вирусного, антигена, способного индуцировать выработку аутоантител к компонентам миелиновой оболочки, и анализ структуры этих антител могут быть весьма перспективными для понимания механизмов развития заболевания, разработки новых подходов к терапии и диагностике РС.

На сегодняшний день не существует медицинского протокола, позволяющего полностью вылечить больного РС. Наиболее часто при РС применяют бетаферон, понижающий уровень воспаления в ЦНС [22], и копаксон, также уменьшающий частоту обострений [23]. Создаются вакцины, направленные на элиминацию аутореактивных В-клеток, среди которых наиболее известен уже зарегистрированный препарат – ритуксимаб – моноклональное антитело, неселективно уничтожающее все В-клетки. Существуют также экспериментальные проекты, направленные на специфическую элиминацию [24] или супрессию [25] именно аутореактивных патогенных В-клеток.

В нашей лаборатории ранее была сконструирована фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител на основе генетического материала больных РС [26]. Был отобран и охарактеризован ряд моноклональных антител, связывающих ОБМ. Для одного из этих антител показана *in vitro* кроссреактивность между ОБМ и белком LMP-1 (latent membrane protein 1) вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ). В последнее время появился целый ряд работ о возможной вирусной индукции заболевания путем молекулярной мимикрии [27–29], поэтому полученные результаты стали дополнительным доказательством триггерной роли ВЭБ. В представленной работе мы решили прояснить, насколько уникальным является образование кроссреактивных аутоантител к ОБМ и LMP-1. Для этого мы целенаправленно получили кроссреактивные клоны путем последовательного обогащения библиотеки на два этих антигена. Проанализировав их структуры и принадлежность к зародышевым семействам, выявили высокое разнообразие подобных кроссреактивных клонов, которые потенциально способны индуцировать РС. Интересно отметить, что большая часть полученных антител обладает высокой гомологией с антителами к белкам других патогенов, что можно рассматривать как расширение списка потенциальных триггеров РС.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

Использовали агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); одно- и двузамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин, фракция V (BCA), бромистый этидий, β-меркаптоэтанол (Sigma, США); акриламид, N',N'-метиленабисакриламид, додецилсульфат натрия (ДСН), мочевины, нитроцеллюлозную мембрану Hybond C extra (Amersham, США); поверхностно активное вещество NP40; глицин, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) (Fermentas, Литва); раствор ТМВ (тетраметилбензидин) (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия), остальные реактивы отечественного производства марки «ос. ч.».

### Ферменты

Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза, щелочная фосфатаза, Rapid DNA Ligation kit (Fermentas, Литва), эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Fermentas, Литва); дезоксирибонуклеаза I (Biozyme Laboratories Ltd., США); трипсин, лизоцим (Merck, Германия); маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Protein Molecular Weight Marker 14.4–116.0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19.0–118.0 кДа (Fermentas, Литва); низкомолекулярный маркер 2.5–16.9 кДа (Amersham, США).

### Антитела

Антитела к с-тус-эпитопу, продуцируемые гибридомой С-МУС; антитела к 3-flag-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); антитела к белку М13 фаговой оболочки, конъюгированные и неконъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare, США).

### Экспрессия белка и его очистка

Препараты очищенного бычьего ОБМ и рекомбинантного человеческого МОГ (30–147 аминокислотных остатков) были приготовлены согласно ранее опубликованной методике [21]. Рекомбинантный LMP-1 экспрессировали в эукариотических клетках линии НЕК293. Клетки НЕК293 были трансфицированы плазмидой pBudCE1.4/EF/LMP1-FLAG-His-Strep с использованием унифектина-56. Клетки лизировали в буфере RIPA с добавлением 1 М мочевины и коктейля ингибиторов (Roche, Германия) в течение ночи при постоянном перемешивании при 4°C. LMP-1 очистили из лизата с использованием агарозы anti-FLAG согласно методике. N- и C-концевые домены



LMP-1 очищали методом аффинной хроматографии на смоле Talon (Clontech, США), а затем с помощью MonoQ-сефарозы (Amersham).

### Обогащение библиотеки

Фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител, полученная из лимфоцитов периферической крови больных РС, описана ранее [26]. Обогащение проводили согласно методике (Tomlison protocol; Source BioScience, <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com>) с небольшими модификациями. На иммунотюбы (Immuno Tubes maxisorp, Nunc, Германия) сорбировали 10 мкг/мл антигена (ОБМ, МОГ, LMP-1) в карбонатном буфере (pH 9.2). Проводили два раунда обогащения на каждый антиген. Два дополнительных раунда с использованием ОБМ в качестве антигена были проведены в случае двойного обогащения на LMP-1/ОБМ.

### Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антиген, разведенный в 0.1 М карбонатном буфере до концентрации 5 мкг/мл, сорбировали на полистироловых планшетах (MaxiSorp, Дания) в течение ночи при 4°C. На следующий день после удаления антигена лунки промывали 3 раза буфером ФСБ с 0.1% Tween 20. Участки неспецифического связывания блокировали 3% раствором БСА в ФСБ, pH 7.2 (37°C, 1 ч). После этого лунки снова промывали трижды буфером ФСБ с 0.1% Tween 20, а затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C с реагентами второго слоя в буфере ФСБ с 0.1% Tween 20. После каждой инкубации проводили отмывку трижды буфером ФСБ с 0.1% Tween 20. Антитела последнего слоя были конъюгированы с пероксидазой хрена. Проявление проводили фирменным реагентом ТМВ (ЗАО «НВО Иммунотех»), реакцию останавливали 10%  $H_3PO_4$ . Оптическую плотность ( $OD_{450}$ ) измеряли с помощью прибора Varioscan Flash microplate reader (Thermo Scientific, США).

### Широкомасштабное секвенирование генов переменных участков $V_H/V_L$ из фаг-дисплейных библиотек

Начальная фаг-дисплейная библиотека РС и четыре подбиблиотеки, обогащенные на разные антигены (ОБМ, МОГ, LMP-1, двойное обогащение LMP-1/ОБМ), были амплифицированы в клетках TG-1 *Escherichia coli*. ПЦР проводили с использованием Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas). Реакционная смесь содержала 5 нг плазмиды ДНК в качестве матрицы и 10 пмоль фланкирующих праймеров. ПЦР-продукты были очищены с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) и лигированы с адап-

торами NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs, Великобритания) с использованием NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). После приготовления образцов библиотеки были проанализированы с помощью Qubit (Invitrogen) – количественно и 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) – качественно. На основе обчислений библиотеки нормировали до концентрации 10 нМ и смешивали в эквимольном соотношении. Амплификацию образцов проводили в соответствии с протоколом (Illumina) с использованием MiSeq с Reagent Kit v2 (2 × 250). Объединение и приведение в соответствие друг с другом связанных прочтений было сделано на базе GW CLC Bio. Характеристики антител определяли непосредственно после широкомасштабного секвенирования с использованием онлайн-ресурса IMG/High V-QUEST [30].

### Параметры фильтров для анализа встречаемости гипервариабельных участков

Результаты выравнивания последовательностей, полученных методом широкомасштабного секвенирования, после анализа с помощью программы IMG/V-QUEST [31] были отфильтрованы по следующим критериям: поле «Functionality» выравнивания должно быть «productive» (последовательность антитела должна быть оценена программой как продуктивная); идентичность аллелей V-гена и зародышевого сегмента из базы IMG/V-QUEST должна быть не меньше 70%; в расчет не брали последовательности легких цепей, идентифицированных программой IMG/V-QUEST как тяжелые цепи.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данной работы мы проанализировали представленность и структуру антител, отобранных на основные аутоантигены РС – ОБМ и МОГ, а также на вирусный белок LMP-1, для которого ранее нами была показана потенциально возможная триггерная роль при РС [26]. С этой целью мы провели по два раунда обогащения на МОГ и LMP-1 (на ОБМ обогащение проведено ранее [26]), для поиска кросс-реактивных антител – последовательно два раунда биопэннинга на LMP-1, а затем два раунда на ОБМ. Все обогащения проводили под контролем поликлонального ИФА. После селекции проанализировали полученные одноцепочечные антитела в составе фаговых частиц методом моноклонального ИФА. Клон считали положительным, если его сигнал на связывание с одним или двумя антигенами в ИФА превышал минимум в 3 раза сигнал бактериофага M13K07, используемого в качестве отрицательного контроля (в титре  $10^{13}$  фаговых частиц/лунку). Результаты ИФА для наиболее перспективных клонов, способ-

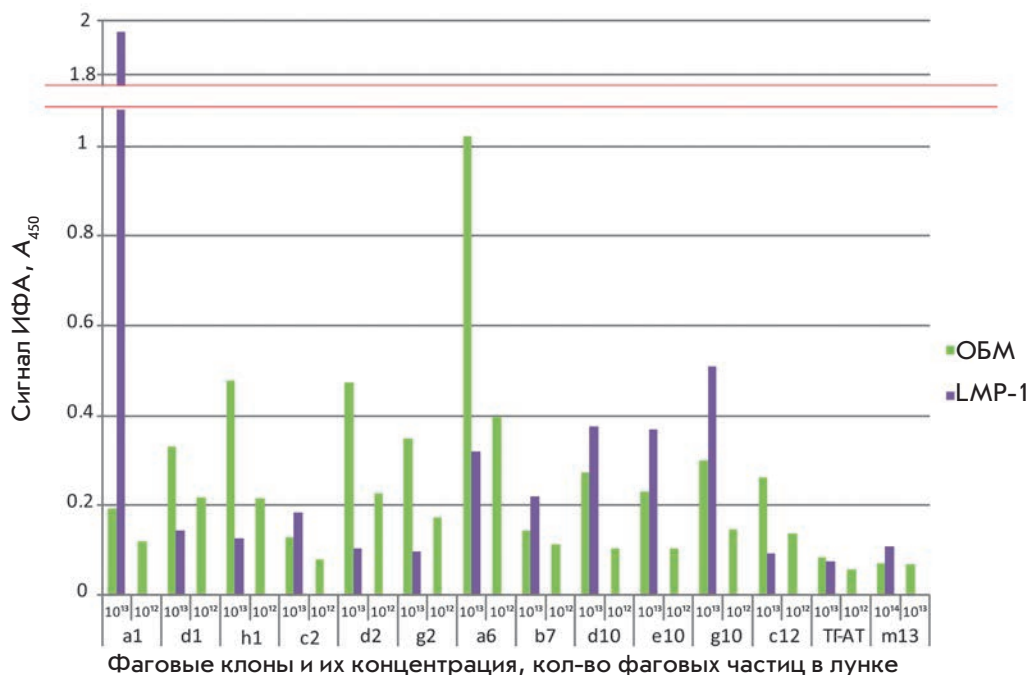


Рис. 1. Моноклональный фаговый ИФА связывания полученных антител с ОБМ (зеленые столбцы) и LMP-1 (фиолетовые столбцы). В качестве отрицательного контроля использовали бактериофаг M13K07 (m13) и бактериофаг, экспонирующий на своей поверхности одноцепочечное антитело, специфичное к тиреоглобулину (ТГ-АТ)

ных связывать и ОБМ, и LMP-1, приведены на рис. 1. Способность данных фаговых клонов связывать оба антигена подтверждена путем проведения не менее трех независимых ИФА.

В результате было отобрано несколько фаговых клонов, несущих одноцепочечные антитела, которые наиболее эффективно связывали LMP-1 или LMP-1/ОБМ. В таблице приведены данные по относительной силе связывания фаговых клонов с исследуемыми антигенами, а также аминокислотные последовательности их гипервариабельных участков и принадлежность к зародышевым семействам. Сравнивая структуры полученных одноцепочечных антител, можно отметить несколько интересных закономерностей: (1) множественный отбор отдельных легких цепей как на LMP-1, так и на два антигена; (2) встречаемость одинаковых легких цепей как в свободном виде, так и в составе одноцепочечных антител – клоны c12 и b3 LL, g3 LL, d4 LL. Селекция определенных легких цепей как в свободном виде при отборе на LMP-1 (b3 LL, g3 LL, d4 LL), так и в составе одноцепочечных антител при получении кроссреактивных клонов (c12) может свидетельствовать об их важной роли в связывании LMP-1, который мы использовали в качестве первого антигена при двойном отборе. В то же время для дальнейшего связывания ОБМ, вероятно, необходима уже их комбинация с тяжелой цепью, т.е. в данном случае связывание с двумя антигенами и потенциальная кроссреактивность определяются узнаванием свое-

го антигена тяжелой и легкой цепью по отдельности. Интересно и то, что относительная сила связывания анти-LMP-1-антител со своим антигеном значительно превышает относительную силу связывания с обоими антигенами потенциально кроссреактивных анти-LMP-1/-анти-ОБМ-антител (таблица). Эти наблюдения могут отражать природную ситуацию, происходящую при развитии РС, когда первично образованные антитела на какой-либо патоген (в частности, ВЭБ) в дальнейшем могут при попадании в ЦНС (при наличии поврежденного гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)) взаимодействовать с ОБМ, вызывая деградацию миелиновой оболочки. По-видимому, способность таких антител к потенциальной полиреактивности, пусть и при слабом связывании, предпочтительней высокой специфичности с сильной аффинностью.

Поиск гомологов отобранных моноклональных антител проводили по аминокислотным последовательностям с помощью баз данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) и программы protein BLAST. На рис. 2 и 3 представлены данные по относительной гомологии между структурами полученных нами антител и иммуноглобулинами, специфичными к белкам различных вирусов и бактерий. Выявлен высокий уровень сходства полученных антител с целым рядом патоген-специфических антител (против вируса гриппа, вируса лихорадки Западного Нила, вируса бешенства, ротавируса, пневмококка, стрептококка и др.)

Одноцепочечные антитела, отобранные после двух раундов фагового дисплея на соответствующие антигены

Клон	Отбор на LMP-1 / ОБМ										Связывание с LMP-1	Связывание с ОБМ
	V <sub>h</sub>	D <sub>h</sub>	J <sub>h</sub>	H-CDR3	V <sub>L</sub>	J <sub>L</sub>	L-CDR3					
b7	IGHV1-2*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	VRGTYSPSGYFEY	IGKV5-2*01	IGKJ2*01	LQHDNFP				+	++
g10	IGHV1-3*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	ARIFEGLSGIAAPFDY	IGKV4-1*01	IGKJ4*01	QQYFSSPLT				+	±
h1	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGKV3-20*01	IGKJ5*01	QQYCCSPIT				±	±
e11	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	AAWDDGSLNGP				±	±
h11	IGHV1-18*04	IGHD3-3*02	IGHJ2*01	ARREGLYTTSPGYFGV	IGLV3-21*03	IGLJ7*02	RVWDDKQTVSRSG				±	+
e12	IGHV1-46*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	ARRGFDY	IGKV1-33*01	IGKJ1*01	LQFYEFPYT				±	±
c11	IGHV1-46*03	IGHD5-12*01	IGHJ6*03	AKDLRPRDIGDMDV	IGKV1-39*01	IGKJ5*01	QQSYSSP				±	+
c12	IGHV1-69*06	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	ARCGILRSHYFYGMVDV	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG				±	+
a6	IGHV3-7*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	VRGGLGAGADY	IGLV4-69*01	IGLJ7*01	QTWGTGI				+	++
c3	IGHV4-b*01	IGHD2-21*01	IGHJ5*01	AGLTQSSHNDAN	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	MQATHWP				±	+
f11 (=e1 LL)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG				±	±
c2	-	-	-	-	IGLV3-1*01	IGLJ7*01	AAWDDSLNGPV				±	±
d1	-	-	-	-	IGLV6-57*01	IGLJ7*01	QSYNTSTLI				±	±
a1	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA				±	±
Отбор на LMP-1												
h4 LL	IGHV3-23*01	IGHD6-13*01	IGHJ2*01	AKDIAAAAATPEY	IGKV3-11*01	IGKJ5*01	QQRSNWPPPT				+++	н.о.
c12 LL	IGHV5-51*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	ARFYDSTGSCDY	IGKV1D-33*01	IGKJ2*02	SIHQXKFPLXC				+++	н.о.
d4 LL, g3 LL, b3 LL	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG				+++	н.о.
e1 LL (=f11)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG				+++	н.о.
d2 LL (=a1)	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA				+++	н.о.

Примечание. LL в названии клона обозначает, что клон отобран на LMP-1. Относительное связывание с антигенами рассчитывали как отношение сигнала ИФА связывания с антигеном определенного фагового клона к сигналу отрицательного контроля M13K07, ± – превышение над фоном в 1.5 и более раз; + – превышение в 3 раза; ++ – превышение в 6 раз; +++ – превышение в 9 и более раз. Описанные клоны показывали статистически значимое связывание с антигенами минимум в трех независимых экспериментах.

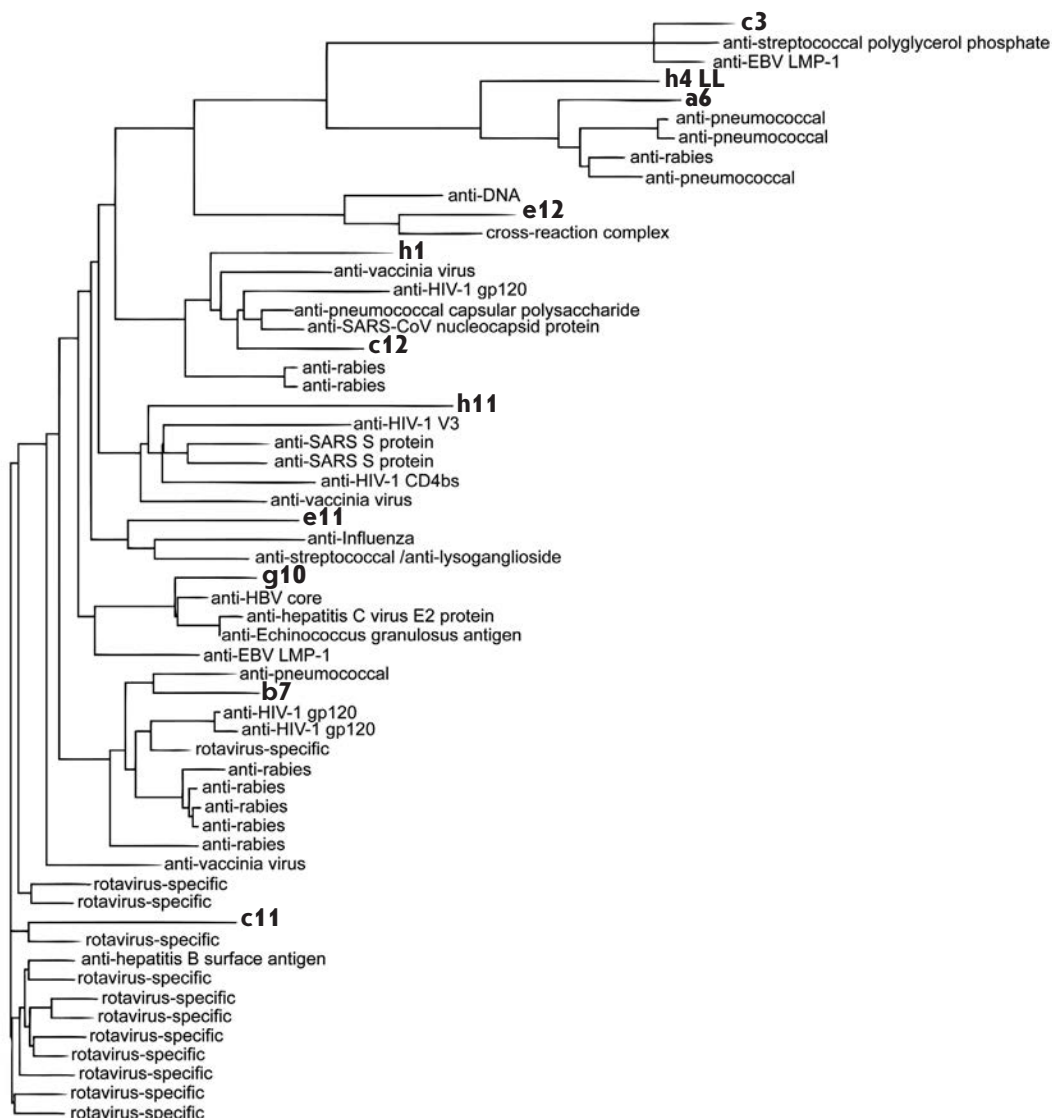


Рис. 2. Гомология тяжелых цепей отобранных антител с противовирусными антителами, известными из опубликованных данных (базы данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot)). Жирным отмечены антитела, отобранные в данной работе

как для тяжелой, так и для легкой цепей. Можно отметить высокий уровень структурного сходства полученных антител с антителами из ЦСЖ РС, анти-МОГ, анти-CD152 (антиген 4 цитотоксических лимфоцитов), антителами к белку Бенс-Джонса. Крайне интересны данные по близости структур тяжелых цепей кроссреактивных антител c3 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55010.1 – гомология 91%), а также кроссреактивного g10 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55014.1 – гомология 86%), что косвенно подтверждает корректность отбора антител из фаговой библиотеки. Среди легких цепей высокая гомология антитела b7 и МОГ-специфичного антитела (gb|AAU15116.1 – гомология 90%) может свидетельствовать о полиреактивности отобранного антитела, а сходство a6 и антитела из ЦСЖ больного РС (gb|AAS21063.1 – гомология 94%) может косвенно подтверждать аутоиммунную

природу отобранного нами антитела. На наш взгляд, высокая провирусная гомология антител, способных связывать ОБМ, потенциально указывает на то, что первичной мишенью для этих антител могут служить многие вирусные белки. Таким образом, для запуска РС и активации патогенных В-клеток, наряду с генетическими и экологическими факторами, необходимо наличие не определенного экзогенного патогена, а его способность, проникая в ЦНС, увлекать за собой клетки иммунной системы, что в итоге приводит к их «множественной и беспорядочной» активации. То есть антителосекретирующие клетки, активированные еще на периферии в лимфатических узлах, мигрируют через поврежденный ГЭБ. Таким образом, первичные антитела к вирусным антигенам начинают взаимодействовать с собственными кроссреактивными аутоантигенами в ЦНС, вызывая





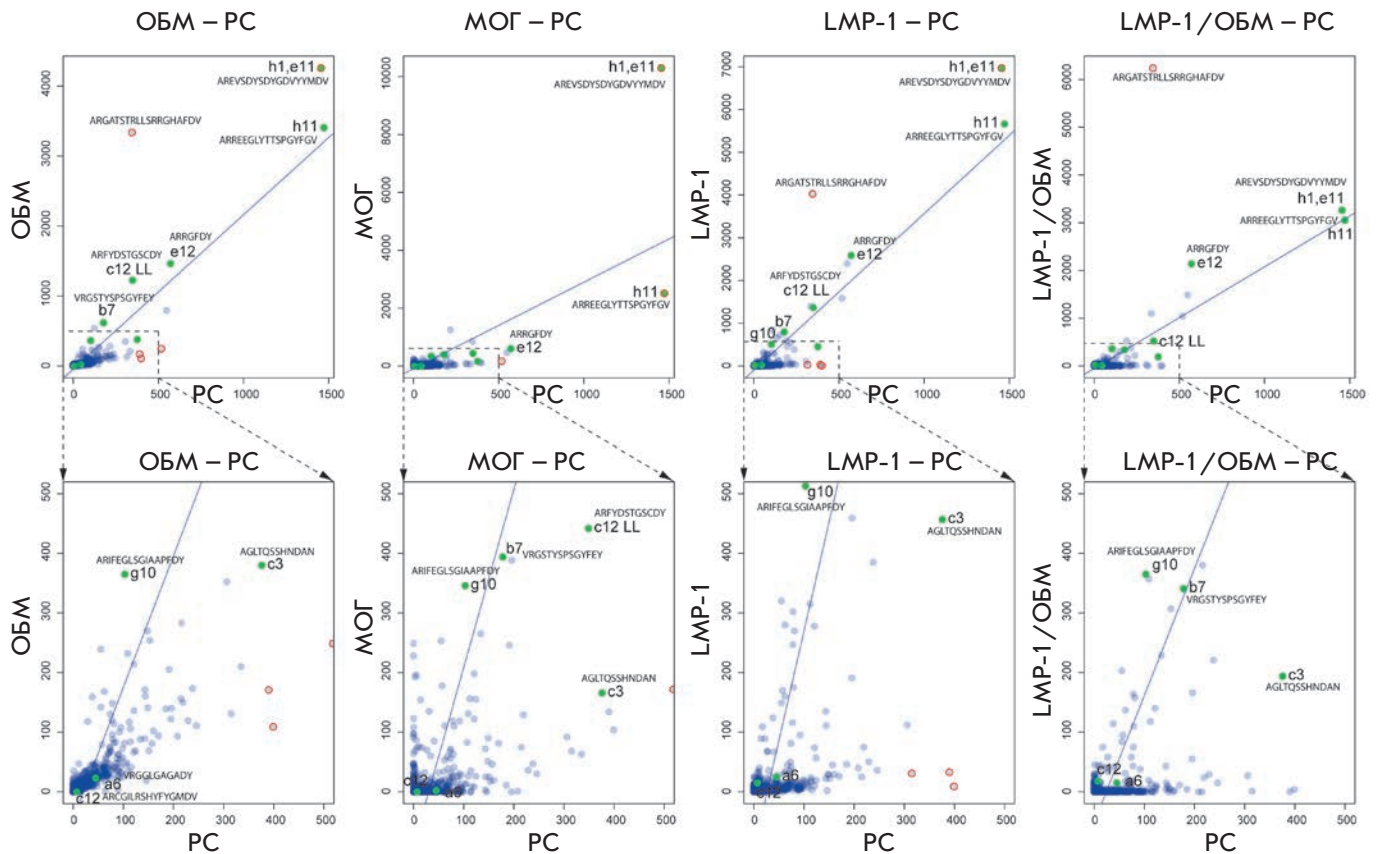


Рис. 4. Сравнение встречаемости CDR3 тяжелых цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ, отмечены точки выброса с помощью пакета 'car' языка R (помечены красным). Также на графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в таблице). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов

локальные воспаления и в дальнейшем развитие заболевания.

Для оценки результатов отбора антител на выбранные антигены проведено широкомасштабное секвенирование обогащенных библиотек. С использованием оборудования Illumina MiSeq определено около 100 000 последовательностей из каждой библиотеки (по 50000 для тяжелых и легких цепей). Далее был проведен анализ отобранных антител по встречаемости CDR3 для тяжелых и легких цепей, а также определены относительные заряды наиболее эффективно отобранных CDR3. Для этого полученные в результате широкомасштабного секвенирования последовательности были выровнены с последовательностями антител из базы данных IMGT [32] с помощью программы IMGT/V-QUEST

[31], а затем результаты выравниваний были отфильтрованы для избавления от артефактов. В дальнейшем анализировали только отфильтрованные результаты секвенирования. Сравнительному анализу подвергали представленность различных CDR3 в обогащенных библиотеках по сравнению с начальной библиотекой PC, считая мерой представленности CDR3 общее число последовательностей, несущих этот CDR3 (рис. 4, 5). На рис. 4, 5 отображена и представленность CDR3-антител, полученных с помощью функционального отбора (таблица). Точки выброса, находящиеся выше регрессионной линии, соответствуют положительному отбору на данный CDR3 (он значительно преобладает в этом отборе по сравнению с остальными CDR3), а точки выброса ниже этой линии – отрицательному

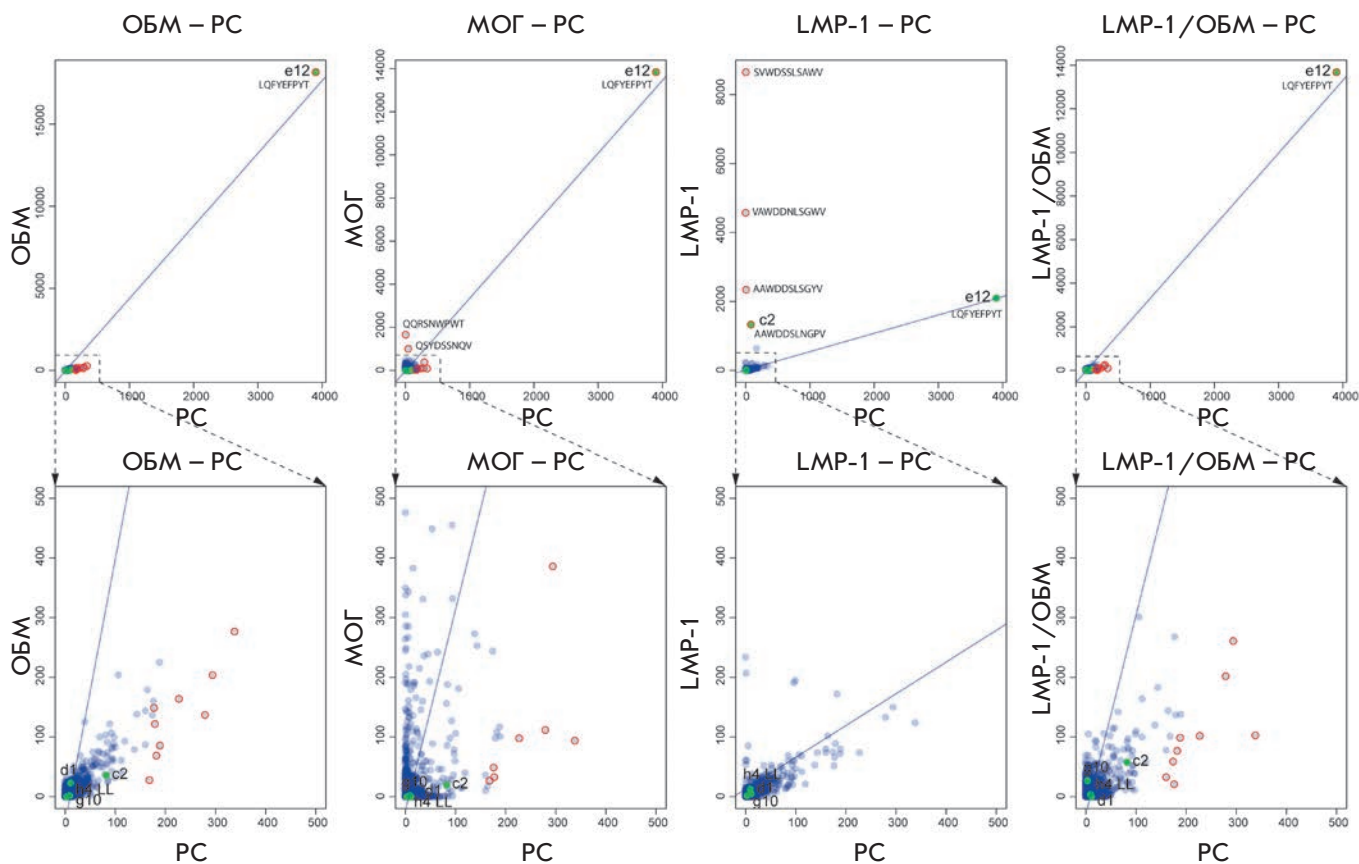


Рис. 5. Сравнение встречаемости CDR3 легких цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ и отмечены точки выброса с помощью пакета 'car' языка R (помечены красным). На графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в таблице). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов

отбору на них. Нас, в первую очередь, интересовали положительные выбросы, так как они были первыми кандидатами на функционально значимые CDR3 в каждом отборе. Как и ожидалось, среди распространенных (по количеству встречаемости) CDR3 преобладает большая часть клонов, выбранных после функционального отбора с помощью моноклонального фагового ИФА. Причем видно, что клоны h1 и e11 имеют CDR3 тяжелой цепи с повышенной полиреактивностью, так как частота его встречаемости увеличена во всех четырех обогащенных библиотеках по сравнению с исходной. А CDR3 клона h11 амплифицировался в библиотеках ОБМ, LMP-1, LMP-1/ОБМ, что может характеризовать его как часть кроссреактивного паратопа для двух общих эпитопов именно у ОБМ и LMP-1. С другой стороны, довольно интересной представляется ситуа-

ция, когда по анализу встречаемости H-CDR3 явный отбор по связыванию ОБМ и LMP-1 прошла последовательность ARGATSTRLLSRRGHAFDV, но методом моноклонального фагового ИФА мы не получили ни одного антитела с таким CDR3. Возможным объяснением может служить ограниченное число клонов, анализируемое при фаговом ИФА. Подобная ситуация может возникнуть и в результате невысокой аффинности конкретного фагового клона к двум антигенам в формате моноклонального ИФА (низкий сигнал при ИФА), в результате чего данный клон не был выбран для дальнейшего анализа. Однако в действительности он количественно прошел отбор на два антигена. В любом случае дальнейший анализ клонов с подобными гипервариабельными участками может помочь прояснить проблему кроссреактивности. Среди легких цепей потенци-

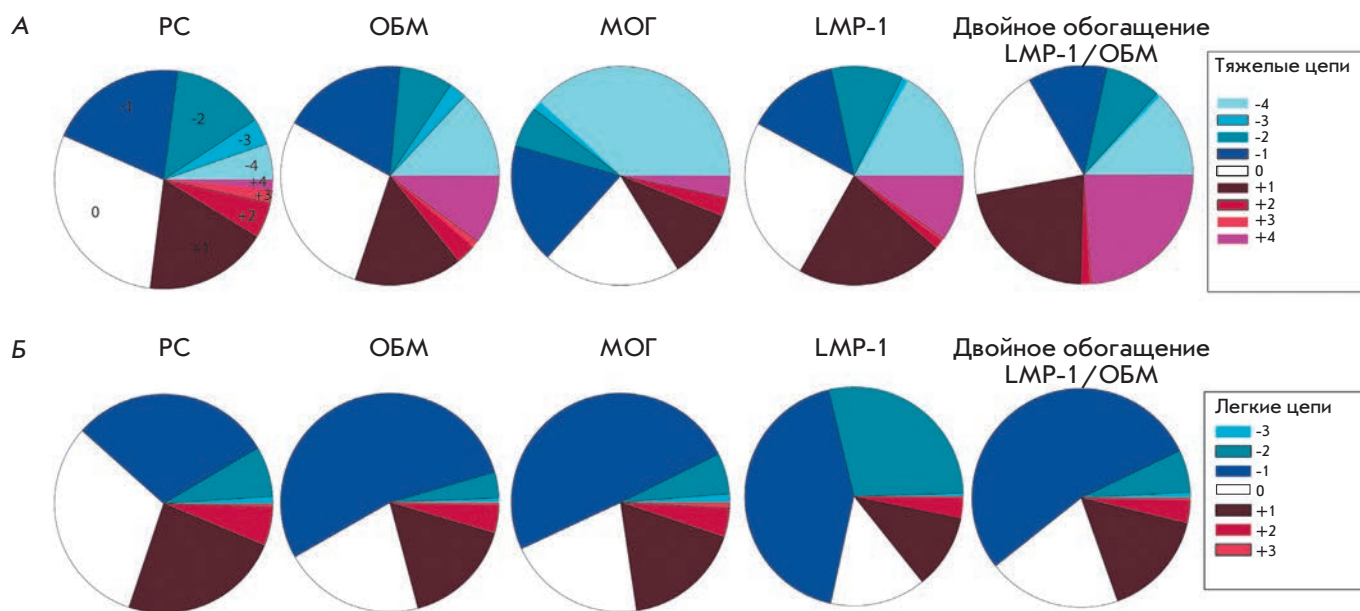


Рис. 6. Распределение суммарного заряда CDR3 в библиотеках, обогащенных на разные антигены для тяжелых (А) и легких (Б) цепей

альной повышенной кроссреактивностью между ОБМ и МОГ обладал CDR3 клонa  $\epsilon 12$ . При этом он был эффективно отобран и в библиотеке LMP-1/ОБМ после обогащения на ОБМ, хотя при обогащении на LMP-1 не наблюдалось эффективного отбора на данный CDR3.

Взаимодействие двух белков во многом обусловлено наличием заряда в области их соприкосновения. Так как у антитела наибольшую роль в формировании сайта связывания играет CDR3, мы решили оценить вклад электростатических взаимодействий данного региона в специфичность связывания при отборе на разные антигены, а также в отборе кроссреактивных клонов. С этой целью мы определили частоту встречаемости CDR3 с разными зарядами для тяжелых и легких цепей (рис. 6), учитывая количество прочтений для каждой последовательности. Можно отметить, что в библиотеке, обогащенной на МОГ, практически на треть уменьшилось количество нейтрально заряженных CDR3 тяжелых цепей и в 7 раз увеличилось количество CDR3 с суммарным высоким отрицательным зарядом (-4 и больше) во многом за счет сокращения положительного заряда (+1). В отборе на остальные антигены наблюдается смещение суммарного заряда в высокозаряженные области как положительные (+4), так и отрицательные (-4). Для легких цепей в основном наблюдается уменьшение количества нейтрально заря-

женных и увеличение слабоотрицательных CDR3 (-1 у ОБМ, МОГ, двойного обогащения LMP-1/ОБМ и -1-2 у LMP-1). Из этих данных можно сделать вывод, что хотя изначально в библиотеке антител больных РС (РС на рис. 6), в некоторой степени отражающей распределение антител в организме больного, преобладают и иммуноглобулины с нейтральными CDR3, тенденцию к проявлению аутореактивности в основном имеют антитела с заряженными остатками в антигенсвязывающих центрах. Причем у тяжелых цепей по сравнению с легкими наблюдается большее смещение заряда в крайние области по модулю – как в положительную, так и в отрицательную стороны. Это может свидетельствовать о более активном участии тяжелой цепи в формировании сайта связывания.

### ВЫВОДЫ

В настоящей работе получены панель антител к ряду аутоантигенов при РС, а также набор кроссреактивных антител, связывающих как белок вируса Эпштейна-Барр, так и структурный элемент миелиновой оболочки – ОБМ. Высокая гомология антител, полученных к выбранным аутоантигенам и патогенам вирусной и бактериальной природы, может свидетельствовать об участии целого ряда вирусов в развитии РС. Полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания



двух цепей – тяжелой и легкой, каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена. В случае последовательного отбора на LMP-1 и ОБМ, проведенного в данной работе, за связывание с LMP-1, более вероятно, отвечает легкая цепь антигена, тогда как комбинация с тяжелой цепью приводит к формированию полноценного кроссреактивного антигена, связывающего как LMP-1, так и ОБМ. Для аутоантигенов, специфичных к исследованным аутоантигенам РС – ОБМ, МОГ и потенциальному вирусному триггеру РС – LMP-1, характерно увеличение заряженных CDR3. ●

Работа поддержана РФФИ  
(гранты № 12-04-01609-а, 12-04-33258,  
12-04-92428-ЕМБЛ-а, 13-04-40277-Н,  
09-04-12128-офи\_м), грантом фонда «Сколково»  
«Персонализированная терапия аутоиммунных  
заболеваний и рака», программами Президиума  
РАН «Фундаментальные науки – медицине»  
и № 27 «Основы фундаментальных исследований  
нанотехнологий и наноматериалов»,  
НШ-2046.2012.4, стипендией Президента РФ  
(СП 2445.2013.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hauser S.L., Oksenberg J.R. // *Neuron*. 2006. V. 52. № 1. P. 61–76.
- Hemmer B., Nessler S., Zhou D., Kieseier B., Hartung H.P. // *Nat. Clin. Practice Neurol.* 2006. V. 2. № 4. P. 201–211.
- Compston A., Coles A. // *Lancet*. 2008. V. 372. № 9648. P. 1502–1517.
- Jersild C., Fog T., Hansen G.S., Thomsen M., Svejgaard A., Dupont B. // *Lancet*. 1973. V. 2. № 7840. P. 1221–1225.
- Barcellos L.F., Oksenberg J.R., Begovich A.B., Martin E.R., Schmidt S., Vittinghoff E., Goodin D.S., Pelletier D., Lincoln R.R., Bucher P., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. № 3. P. 710–716.
- Marrosu M.G., Murru R., Murru M.R., Costa G., Zavattari P., Whalen M., Cocco E., Mancosu C., Schirru L., Solla E., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 25. P. 2907–2916.
- Dyment D.A., Herrera B.M., Cader M.Z., Willer C.J., Lincoln M.R., Sadovnick A.D., Risch N., Ebers G.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 14. P. 2019–2026.
- Masterman T., Ligiers A., Olsson T., Andersson M., Olerup O., Hillert J. // *Ann. Neurol.* 2000. V. 48. № 2. P. 211–219.
- Barcellos L.F., Sawcer S., Ramsay P.P., Baranzini S.E., Thomson G., Briggs F., Cree B.C., Begovich A.B., Villoslada P., Montalban X., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 18. P. 2813–2824.
- Ramagopalan S.V., Morris A.P., Dyment D.A., Herrera B.M., DeLuca G.C., Lincoln M.R., Orton S.M., Chao M.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 9. P. 1607–1613.
- Robertson N.P., Fraser M., Deans J., Clayton D., Walker N., Compston D.A. // *Brain*. 1996. V. 119. Pt 2. P. 449–455.
- Sadovnick A.D., Baird P.A., Ward R.H. // *Am. J. Med. Genet.* 1988. V. 29. № 3. P. 533–541.
- Willer C.J., Dyment D.A., Risch N.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C., Canadian Collaborative Study G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 22. P. 12877–12882.
- Ebers G.C., Sadovnick A.D., Dyment D.A., Yee I.M., Willer C.J., Risch N. // *Lancet*. 2004. V. 363. № 9423. P. 1773–1774.
- Sokolova E.A., Malkova N.A., Korobko D.S., Rozhdestvenskii A.S., Kakulya A.V., Khanokh E.V., Delov R.A., Platonov F.A., Popova T.Y., Aref'eva E.G., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. e61032.
- Царева Е.Ю., Кулакова О.Г., Макарычева О.Ю., Бойко А.Н., Щур С.Г., Лац Н.Ю., Попова Н.Ф., Гусев Е.И., Башинская В.В., Львов Д.В. и др. // *Мол. биол.* 2011. Т. 45. № 6. С. 963–972.
- Yong V.W., Marks S. // *Neurology*. 2010. V. 74. Suppl 1. P. S9–S16.
- Lund F.E., Randall T.D. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 4. P. 236–247.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Aleksandrova E.S., Telegin G.B., Chamborant O.G., Sidorik L.L., Suchkov S.V., Alekberova Z.S., Gnuchev N.V., et al. // *J. Immunol. Meth.* 2002. V. 269. № 1–2. P. 197–211.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Telegin G.B., Suchkov S.V., Misikov V.K., Morse H.C., Gabibov A.G. // *Immunol. Lett.* 2006. V. 103. № 1. P. 45–50.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 2. P. 281–286.
- Paty D.W., Li D.K. // *Neurology*. 1993. V. 43. № 4. P. 662–667.
- Sela M. // *Rejuvenation Res.* 2006. V. 9. № 1. P. 126–133.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Belogurov A.A. Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 1. P. 222–231.
- Gabibov A.G., Belogurov A.A. Jr., Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., et al. // *FASEB J.* 2011. V. 25. № 12. P. 4211–4221.
- Wekerle H., Hohlfeld R. // *N. Eng. J. Med.* 2003. V. 349. № 2. P. 185–186.
- Lunemann J.D., Jelcic I., Roberts S., Lutterotti A., Tackenberg B., Martin R., Munz C. // *J. Exp. Med.* 2008. V. 205. № 8. P. 1763–1773.
- Chastain E.M., Miller S.D. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 245. № 1. P. 227–238.
- Alamyar E., Giudicelli V., Li S., Duroux P., Lefranc M.P. // *Immunome Res.* 2012. V. 8. № 1. P. 26.
- Brochet X., Lefranc M.P., Giudicelli V. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. W503–508.
- Lefranc M.P., Giudicelli V., Ginestoux C., Jabado-Michaloud J., Folch G., Bellahcene F., Wu Y., Gemrot E., Brochet X., Lane J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. D1006–1012.

УДК 615.214.32:577.27

# Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106

С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева, Т. Л. Гарибова\*, Г. М. Молодавкин, С. А. Литвинова, О. А. Елизарова, В. И. Посева

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

\*E-mail: t\_garibova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2013

**РЕФЕРАТ** Большое число клинических и экспериментальных данных свидетельствуют о вовлечении в патогенез депрессии нейротрофинов, в частности BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Вместе с тем терапевтическое использование самого BDNF ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), наличием побочных эффектов. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры четвертой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина). Установлено, что ГСБ-106 при его внутрибрюшинном введении беспородным мышам и крысам оказывает антидепрессивное действие на различных моделях депрессивноподобного состояния. Эффект вещества выявляется при его ежедневном введении в течение 4–5 дней в тесте вынужденного плавания по Порсолту (0.1 и 1.0 мг/кг) и в тесте подвешивания мышей за хвост (1.0 и 1.5 мг/кг). В опытах на крысах в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура эффект ГСБ-106 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг наблюдали при однократном применении. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о вовлечении BDNF в патогенез различных форм депрессивных состояний, что открывает перспективу поиска новых оригинальных антидепрессантов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** BDNF, миметик, ГСБ-106, антидепрессивное действие, неизбежное плавание, подвешивание за хвост.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** MAO – моноаминоксидаза; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – мозговой нейротрофический фактор; ГСБ-106 – гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина); TrkB (tropomyosin-related kinase B) – тирозинкиназный рецептор типа B; АКТ (serine/threonine protein kinase) – серин/треониновая протеинкиназа; CREB (cAMP response element binding protein) – cAMP-зависимый транскрипционный фактор; ERK (extracellular signal-regulated kinase) – протеинкиназа, регулируемая внеклеточными сигналами.

## ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, депрессией страдают 4–5% населения земного шара, а к 2030 году депрессии могут выйти на первое место по распространенности среди других заболеваний [1, 2]. Уже в настоящее время в экономически развитых странах эндогенными и психогенными депрессивными расстройствами страдают около 20% психически больных [3].

На протяжении многих лет в качестве основного патофизиологического механизма развития депрессивных расстройств рассматривается дезрегуляция основных моноаминергических систем головного моз-

га, включая серотонинергическую, норадренергическую, дофаминергическую. Применение практически всех используемых в настоящее время антидепрессантов, являющихся либо ингибиторами моноаминоксидазы (MAO), либо ингибиторами обратного захвата моноаминов, не всегда приводит к клинически требуемым результатам.

В последнее десятилетие накопилось много данных, свидетельствующих о важной роли изменений уровня нейротрофинов, особенно BDNF, в патогенезе депрессий [4–6]. Клинические исследования показывают, что в крови больных с глубокой депрессией со-

держание BDNF значительно снижено и восстанавливается при приеме антидепрессантов [7, 8].

На моделях депрессии показано, что при центральном введении BDNF проявляет выраженный антидепрессивный эффект [9, 10]. Об антидепрессивных свойствах BDNF свидетельствует также большая устойчивость к депрессии трансгенных мышей с повышенным уровнем этого нейротрофина [11]. Кроме того, выявлена положительная обратная связь между BDNF и серотонином [12].

Терапевтическое использование самого BDNF ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, возможностью иммунной реакции и побочными эффектами за счет его плейотропности.

В связи с этим перспективной представляется стратегия создания на основе низкомолекулярных миметиков BDNF новых веществ, которые обладали бы антидепрессивной активностью при системном введении и не имели побочных эффектов полноразмерного нейротрофина. Описан ряд низкомолекулярных миметиков BDNF. Так, группа австралийских исследователей сконструировала димерные бициклические и трициклические пептиды на основе второй петли с агонистической активностью [13]. Группой американских ученых [14] также на основе второй петли получены семь непептидных соединений. Вместе с тем отсутствуют данные об антидепрессивной активности описанных миметиков BDNF.

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры четвертой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик ГСБ-106 [15, 16], представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина). ГСБ-106 был отобран в процессе фармакологического скрининга из четырех соединений, миметиков первой и четвертой петель BDNF, как димерный дипептид, обладающий антидепрессивной активностью у мышей линии Valb/c при однократном введении в тесте вынужденного плавания по Порсолту [16].

Исследования ГСБ-106 *in vitro* на культуре иммортализованных клеток линии HT22 гиппокампа мыши показали, что в концентрации от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  М это соединение проявляет нейропротективную активность на моделях окислительного стресса и глутаматной токсичности. Нейропротективное действие ГСБ-106 выявлено также на клетках линии SH-SY5Y нейробластомы человека в условиях действия нейротоксина 6-оксидофамина [17].

Цель настоящей работы состояла в изучении антидепрессивных свойств ГСБ-106 на различных моде-

лях депрессивных состояний на беспородных мышах и крысах как при однократном, так и субхроническом введении.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГСБ-106 изучали на белых беспородных крысах-самцах (2–2.5 мес., масса 270–290 г) и мышах-самцах массой 22–25 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев». Исследование проведено в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». В исследовании использовали ГСБ-106, синтезированный в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН.

Антидепрессивную активность соединений оценивали в тестах неизбежного плавания по Порсолту [18], вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура [19] и в тесте подвешивания мышей за хвост по Стеру (Steru) [20].

Установка для создания депрессивноподобного состояния (поведенческого отчаяния) по методу Порсолта у мышей представляет собой сосуд цилиндрической формы диаметром 10 см и высотой 30 см. Сосуд на высоту 18 см наполняют водой, температура которой поддерживается на уровне 27°C. Предварительно, за 1 сут до тестирования, каждое животное опускают в сосуд с водой на 5–6 мин для адаптации. В день эксперимента животное помещают в сосуд с водой таким образом, чтобы оно не могло ни выбраться из сосуда, ни найти в нем опору. Попадая в воду, животные начинают проявлять бурную двигательную активность, направленную на поиск выхода из авersive стрессорной ситуации, но затем оставляют эти попытки и зависают в воде в характерной позе, оставаясь полностью неподвижными или совершая незначительные движения, необходимые для поддержания головы над поверхностью воды. Это поведение расценивается как проявление отчаяния, подавленности, депрессивноподобного состояния [18]. Показателем выраженности депрессивноподобного состояния в данном тесте служит длительность неподвижности, т.е. сумма эпизодов иммобилизации у каждого животного в течение 6 мин наблюдения. Критерием антидепрессивной активности считается статистически значимое уменьшение длительности иммобилизации.

Для создания депрессивноподобного состояния у крыс по методу Номура [19] в сосуде с водой и свободно вращающимися колесами была использована четырехканальная установка, разработан-

Таблица 1. Антидепрессивное действие ГСБ-106 у мышей (по Порсолту)

Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг, 1 раз в сутки	Кратность введения	Время иммобилизации, с (M ± SEM)
Контроль (физ. раствор)	1	255.61 ± 25.07
0.1	1	206.29 ± 33.35
1.0	1	204.83 ± 26.67
Контроль (физ. раствор)	5	278.38 ± 12.02
0.1	5	231.41 ± 11.22*
Контроль (физ. раствор)	4	271.73 ± 13.37
1.0	4	205.76 ± 11.02*
Контроль (физ. раствор)	1	238.50 ± 15.37
Амитриптилин, 10.0 мг/кг	1	134.62 ± 23.42*

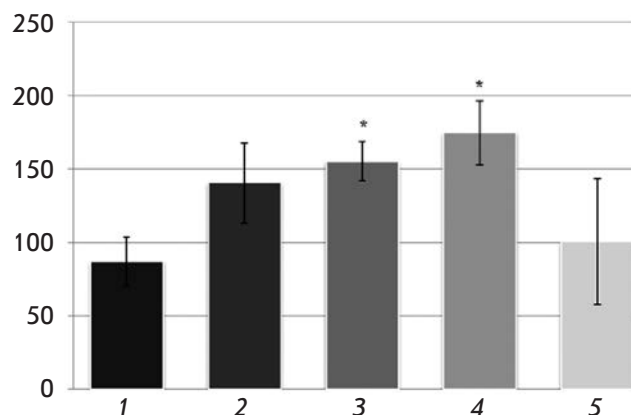
\* –  $p < 0.05$  – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни в сравнении с группой контроля.

ная в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН [21]. Установка представляет собой сосуд размером  $64 \times 30 \times 42$  см, разделенный на четыре равных отсека. В отсеках находятся колеса шириной 11 см с 12 лопастями шириной 2 см, наружный диаметр колес 10 см. На краях каждого колеса укреплены магниты, а над колесами – герконы, которые срабатывают каждый раз, когда магнит проходит под ними, и таким образом происходит автоматическая регистрация оборотов колес, служащая объективной мерой активности животных. Сосуд заполняли водой с температурой  $25^\circ\text{C}$  до середины колес. Крыс помещали в каждый отсек мордой от колеса и регистрировали число оборотов колес в течение 10 мин с помощью электромеханических счетчиков.

В тесте подвешивания мышей за хвост [20] животных привязывали за хвост на горизонтальную перекладину. Сначала животные, попадая в стрессорные условия, начинают проявлять двигательную активность, направленную на поиск выхода из аверсивной ситуации, но затем оставляют эти попытки и висят на перекладине, оставаясь почти полностью неподвижными.

Дипептид ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили животным внутривенно в дозах 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 и 1.5 мг/кг за 30 мин до тестирования, однократно или повторно раз в день в течение 4–5 дней. Контрольные животные получали в том же режиме физиологический раствор.

Статистическую обработку результатов проводили по программе Biostatistics III с использованием методов Стьюдента и Манна–Уитни.



Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивного состояния по Номура. Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг: 1 – контроль; 2 – 0.01; 3 – 0.1; 4 – 0.5; 5 – 1.0. По вертикали – число оборотов колеса. \* –  $p < 0.05$  статистическая значимость отличий от контрольной группы по критерию Манна–Уитни

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания по Порсолту у мышей

Установлено, что у контрольных мышей после периода активности возникает иммобилизация, величина которой в разных группах составляет 238–278 с (табл. 1). При однократном введении ГСБ-106 в дозе 0.1 и 1.0 мг/кг уменьшает время иммобилизации на уровне тенденции (табл. 1).

При субхроническом пятидневном введении ГСБ-106 в дозе 0.1 мг/кг или четырехдневном введении в дозе 1.0 мг/кг корректирует поведение животных в тесте вынужденного плавания, статистически значимо уменьшая время эпизодов иммобилизации по сравнению с контрольной группой: в 1.2 раза при использовании ГСБ-106 в дозе 0.1 мг/кг и в 1.3 раза при введении ГСБ-106 в дозе 1.0 мг/кг (табл. 1).

Таким образом, в тесте поведенческого отчаяния по Порсолту ГСБ-106 в дозе 0.1 и 1.0 мг/кг при повторном 4–5-дневном введении обладает антидепрессивным влиянием, которое выражается в статистически значимом уменьшении времени иммобилизации животных. Описано увеличение антидепрессивного эффекта при многократном введении и самого BDNF. Так, при однократной билатеральной инъекции в гиппокамп BDNF (0.25–1.0 мкг) уменьшал время иммобилизации в 2 раза [10], а при семидневной инфузии в средний мозг крысам в дозе 12–24 мкг/день уменьшал время иммобилизации в тесте неизбежного плавания по Порсолту в 3 раза [9].



**Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивноподобного состояния по Номура у крыс**

Установлено, что крысы контрольной группы совершают в среднем 87 оборотов колес за 5 мин регистрации (рисунки). ГСБ-106 в дозе 0.01 мг/кг не вызывает увеличения оборотов колес, но при повышении дозы ГСБ-106 до 0.1 мг/кг выявляется отчетливая антидепрессивная активность вещества, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение (в 1.8 раза) числа совершаемых крысами оборотов колес по сравнению с показателями контрольных животных (рисунки). Антидепрессивный эффект ГСБ-106 в дозе 0.5 мг/кг усиливается, и число совершаемых крысами оборотов колес увеличивается в 2 раза. Однако при дальнейшем увеличении дозы ГСБ-106 до 1.0 мг/кг его антидепрессивный эффект уменьшается, и показатель оборота колес не отличается от показателя у контрольных животных (рисунки).

Таким образом, ГСБ-106 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг оказывает отчетливое антидепрессивное действие в тесте вынужденного плавания по Номура. Кривая зависимости доза–эффект ГСБ-106 имеет колоколообразный характер.

**Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивноподобного состояния, вызванного подвешиванием мышей за хвост**

Установлено, что в контрольной группе животных среднее время иммобилизации при подвешивании за хвост составляет в разных группах 174 и 148 с. ГСБ-106 при субхроническом (4 дня) внутрибрюшинном введении в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг не изменяет продолжительность иммобилизации мышей в этом тесте по сравнению с контролем. Вместе с тем при повышении дозы ГСБ-106 оказывает отчетливый антидепрессивный эффект. В дозе 1.0 и 1.5 мг/кг ГСБ-106 (4 дня, внутрибрюшинно) статистически значимо ( $p = 0.04$ ) уменьшает (в 1.3 раза) время иммобилизации мышей в тесте подвешивания за хвост (табл. 2).

Таким образом, антидепрессивное действие дипептида ГСБ-106 отчетливо выражено в условиях трех валидированных методов моделирования депрессивноподобного состояния: в тесте поведенческого отчаяния по Порсолту (0.1 и 1.0 мг/кг, 4–5 дней), в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура (0.1 и 0.5 мг/кг, однократно) и в тесте подвешивания мышей за хвост по Стеру (1.0 и 1.5 мг/кг, 4 дня).

Важно, что антидепрессивный эффект ГСБ-106 выявляется при его системном внутрибрюшинном введении беспородным мышам и крысам как однократно, так и повторно ежедневно в интервале доз

**Таблица 2.** Антидепрессивное действие ГСБ-106 при субхроническом (4 дня) введении в тесте депрессивноподобного состояния, вызванного подвешиванием мышей за хвост

Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг	Время иммобилизации, с ( $M \pm SEM$ )
Контроль (физ. раствор)	174.00 $\pm$ 10.4
0.1	145.20 $\pm$ 15.81
1.0	135.50 $\pm$ 12.85*
Контроль (физ. раствор)	148.25 $\pm$ 6.38
0.5	126.22 $\pm$ 9.89
1.5	120.13 $\pm$ 10.53*

\*Статистическая значимость отличий от контроля, при  $p \leq 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

0.1–1.5 мг/кг. Более выраженный эффект ГСБ-106 у крыс, по-видимому, связан с видовыми различиями и методическими особенностями оценки.

Как отмечалось выше, согласно нейротрофиновой теории развития депрессии низкие уровни BDNF в центральной нервной системе приводят к повреждению структур головного мозга и развитию депрессивных состояний, а применение антидепрессантов или введение животным BDNF корректирует эти нарушения. Полученный в настоящей работе антидепрессивный эффект ГСБ-106 сходен с эффектом BDNF при интравентрикулярной инфузии или введении последнего в отделы мозга животных, ответственные за депрессию [8–10]. В работе Schmidt и Duman [22] системное (подкожное) введение мышам рекомбинантного BDNF вызывало антидепрессивный эффект, характеризующийся уменьшением в 1.5 раза иммобилизации в тесте вынужденного плавания. Вместе с тем этот эффект BDNF наблюдался лишь при его использовании в дозах, в 6–7 раз превышающих дозы ГСБ-106, и только после длительного (7–14 сут) введения. Функциональными последствиями антидепрессивного действия рекомбинантного BDNF была индукция нейрогенеза в гиппокампе и среднем мозге, механизм которой авторы связывают с выявленным увеличением уровня BDNF и повышением уровня активации/фосфорилирования ERK и CREB нижележащих мишеней сигнальных путей BDNF-TrkB [22]. Ранее мы установили, что ГСБ-106, миметик BDNF, активирует TrkB и его сигнальные пути ERK и АКТ [23], вовлеченные в выживаемость нейронов, и этим, возможно, определяется его антидепрессивный эффект. Причем способность фосфорилировать TrkB у димерного дипептида ГСБ-106 была селективной, так как на клетках линии PC12,

не экспрессирующей полноразмерный TrkB, но экспрессирующей другие рецепторы нейротрофинов, нейропротективная активность у ГСБ-106 не была выявлена [23].

Полученные нами данные об антидепрессивной активности низкомолекулярного миметика BDNF

ГСБ-106, с одной стороны, подтверждают гипотезу о вовлечении BDNF в патогенез различных форм депрессивных состояний, а с другой – открывают перспективу разработки на основе вновь синтезированного соединения нового оригинального по структуре и механизму действия антидепрессанта. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бюллетень ВОЗ. 10 фактов о глобальном бремени болезней // 2008. [http://www.who.int/features/factfiles/global\\_burden/ru/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/global_burden/ru/index.html)
2. Sartorius N. // *Med. Res.* 2001. V. 1. P. 20–21.
3. Wittchen H.U. // *Обзорение психиатр. и мед. психологии им. В.М. Бехтерева.* 2005. № 4. С. 42–46.
4. Angelucci F., Mathe A.A., Aloe L. // *Progr. Brain Res.* 2004. V. 146. P. 151–165.
5. Yu H., Chen Z.Y. // *Acta Pharmacol. Sinica.* 2011. V. 32. P. 3–11.
6. Neto F.L., Borges G., Torres-Sanchez S., Mico J.A., Berrocoso E. // *Curr. Neuropharmacology.* 2011. V. 9. № 4. P. 530–552.
7. Karege F., Perret G., Bondolfi G., Schwald M., Bertschy G., Aubry J.M. // *Psychiatry Res.* 2002. V. 109. P. 143–148.
8. Chen B., Dowlatshahi D., MacQueen G.M., Wang J.F., Young L.T. // *Biol. Psychiatry.* 2001. V. 50. P. 260–265.
9. Siuciak J.A., Lewis D.R., Wiegand S.J., Lindsay R.M. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997. V. 56. P. 131–137.
10. Shirayama J., Chen A.C., Nakagawa S., Russel R.S., Duman R.S. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 3251–3261.
11. Govindarajan A., Rao B.S.S., Nair D., Trinh M., Mawjee N., Tonegawa S., Chattarji S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 35. P. 13208–13213.
12. Siuciak J.A., Altar C.A., Wiegand S.J., Lindsay R.M. // *Brain Res.* 1994. V. 663. P. 326–330.
13. O'Leary P.D., Huges R.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 25738–25744.
14. Massa S.M., Yang T., Xie Y., Shi J., Bilgen M., Joyce J.N., Nehama D., Rajadas J., Longo F.M. // *J. Clin. Investigation.* 2010. V. 120. P. 1774–1785.
15. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // *Пат. РФ № 2410392.* 2011. Приоритет от 16.02.2009.
16. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Биоорган. химия.* 2012. Т. 38. С. 280–290.
17. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Середенин С.Б. // *Бюл. экп. биол. мед.* 2013. Т. 155. № 3. С. 319–323.
18. Porsolt B.D., Bertin A., Jalfre M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 51. P. 291–294.
19. Nomura S., Shimizu J., Kinjo M., Kametani H., Nakazava T. // *Eur. J. Pharmacol.* 1982. V. 83. P. 171–175.
20. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. // *Psychopharmacology.* 1985. V. 85. P. 367–370.
21. Молодавкин Г.М., Воронина Т.А., Мдзинаришвили А.Л. // *Эксп. клин. фармакология.* 1994. Т. 1. С. 3–5.
22. Schmidt H.D., Duman R.S. // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 2378–2391.
23. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2013. Т. 451. № 5. С. 577–580.

УДК 57.085.23

# Трехмерная модель мышиногo эпидермиса для лабораторных исследований псориаза

А. Г. Соболева, В. В. Соболев, А. С. Брускин, А. В. Мезенцев\*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

\*E-mail: mesentsev@vigg.ru

Поступила в редакцию 27.02.2013

**РЕФЕРАТ** Трехмерные модели кожи и эпидермиса позволяют получать достоверную информацию о таких заболеваниях, как псориаз, поскольку они точно имитируют структуру кожи. Из кератиноцитов новорожденных мышат нами получена трехмерная модель эпидермиса, которую обработали цитокинами. В представленной работе оценена пригодность этой трехмерной модели для изучения псориаза, описаны изменения в ее структуре и экспрессии генов после обработки провоспалительными цитокинами. Показано, что обработка трехмерной модели интерлейкином 17 или комбинацией фактора некроза опухолей и интерферона  $\gamma$  приводит к изменениям структуры, сходным с проявлениями акантоза при псориазе. Наблюдаемые изменения в экспрессии генов металлопротеиназ и других биомаркеров псориаза (*mki67*, *krt16* и *fosl1*) были сходны с изменениями в пораженной коже больных. Обработка модели интерфероном  $\gamma$  и фактором некроза опухолей приводит к более выраженным изменениям экспрессии генов, чем обработка интерлейкином 17. Напротив, обработка клеток HaCaT фактором некроза опухолей и интерфероном  $\gamma$  не влияла существенно на экспрессию *fosl1*, но снижала экспрессию *mki67*, интерлейкин 17 практически не влиял на экспрессию *krt16* и *mki67*, но снижал экспрессию *fosl1*. Результаты исследования подтверждают возможность использования трехмерной модели эпидермиса мыши для изучения псориаза.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** акантоз, количественная ПЦР, корнификация, культивирование клеток, псориаз, трехмерное моделирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИЛ-1 – интерлейкин 1; ИЛ-17 – интерлейкин 17; ИФНГ – интерферон  $\gamma$ ; MMP1 – интерстициальная коллагеназа (interstitial collagenase [КФ 3.4.24.7]); ТММЭ – трехмерная модель мышиногo эпидермиса; ФНО – фактор некроза опухолей.

## ВВЕДЕНИЕ

Трехмерные модели кожи и эпидермиса стали сравнительно широко использоваться в лабораторных испытаниях косметических продуктов, а также при ранениях и ожогах [1–3]. Практика применения трехмерных моделей соответствует законодательству Евросоюза, которое направлено на сокращение использования лабораторных животных и требует доказательств как экологической безопасности, так и эффективности экспериментальных процедур [4, 5]. Трехмерные модели кожи и эпидермиса интересны прежде всего тем, что позволяют одновременно тестировать множество лекарственных препаратов и учитывать при этом метаболические изменения, возникающие в ходе дифференцировки кератиноцитов. Таким образом, трехмерные клеточные модели можно использовать для изучения структурных изменений в тканях при различных патологиях.

В отличие от традиционного метода культивирования клеток в виде монослоя, при котором отдельные

клетки мало отличаются друг от друга, трехмерные лабораторные модели кожи и эпидермиса имитируют не только взаимодействие клеток с межклеточным матриксом и межклеточные контакты, но и изменения в экспрессии генов. Таким образом, трехмерные модели могут служить более достоверным источником информации о патологических изменениях в тканях, таких, как реструктуризация эпидермиса при псориазе. И это делает их незаменимым инструментом при экспериментальных исследованиях. Принимая во внимание ограниченный доступ научных учреждений к донорской коже, мы предполагаем разработать новый экспериментальный подход к оценке изменений в пролиферации и дифференцировке кератиноцитов, а также трансформации здоровой кожи в псориазической бляшке без использования клеток человека.

Предполагается, что появление и рост псориазических бляшек обусловлены секрецией провоспалительных цитокинов ФНО, ИФНГ и ИЛ-17 иммунны-

ми клетками, которые присутствуют в эпидермисе больного [6]. Эти цитокины в свою очередь активируют кератиноциты, внося изменения в программу их дифференцировки и увеличивая скорость их пролиферации. Руководствуясь этими представлениями, мы обрабатывали трехмерную модель эпидермиса мыши либо комбинацией ФНО и ИФНГ, либо ИЛ-17. Затем мы оценили вызванные цитокинами изменения в структуре модели и уровне генной экспрессии. Таким образом, в данной работе мы попытались проверить способность нашей модели воспроизводить некоторые характерные изменения в коже больных псориазом и оценить ее пригодность для дальнейшего изучения этого заболевания.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Получение и обработка образцов кожи

Образцы кожи больных псориазом (*psoriasis vulgaris*, псориаз бляшечного типа) получали с помощью дерматологического пробойника (4 мм) под местной анестезией. Образцы кожи получали от больных, не проходивших курса какой-либо системной или PUVA/UV-терапии в течение 1 месяца до взятия биопсии. Биопсии непораженной кожи для проведения сравнительного анализа забирали на расстоянии не менее 3–4 см от очага поражения. Образцы, предназначенные для выделения РНК, быстро замораживали в жидком азоте и перевозили в лабораторию. Пробы взвешивали и измельчали в ступке, не допуская размораживания образца. Из образцов выделяли РНК и проводили количественную ПЦР. Биопсии кожи, предназначенные для гистологического анализа, фиксировали в формалине. Данный протокол одобрен комитетом по этике Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Этот протокол соответствует принципам, изложенным в Хельсинкской декларации, и российскому законодательству, регулирующему проведение научных исследований с донорской тканью.

#### Получение первичных кератиноцитов новорожденных мышат

Для получения культуры эпидермальных кератиноцитов трупы новорожденных мышат обеззараживали бетадином и последовательно промывали 70% этанолом, гентамицином и изотоническим фосфатным буферным раствором (PBS). Снятую кожу разравнивали на доньшке пластиковой чашки и инкубировали в 0.25% растворе трипсина («ПанЭко», Россия) в течение 14–16 ч. На следующий день эпидермис отделяли от дермы, измельчали ножницами и инкубировали в среде KSFМ (Life Technologies, США) при 37°C в течение 30 мин. Полученную суспензию клеток филь-

тровали через капроновое сито с диаметром ячеек 70 мкм (Sigma-Aldrich, США). Клетки осаждали центрифугированием (250 g; 5 мин), считали и культивировали в среде KSFМ с добавкой набора реагентов S7 (Life Technologies, США),  $1.1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> в флаконах T25. Клетки высевали во флаконы, покрытые коллагеном (Sigma-Aldrich, США). Дифференцировку клеток предотвращали, поддерживая концентрацию ионов кальция в среде не более 60 мкМ. Неприкрепившиеся клетки удаляли на следующий день после посева. Данный протокол одобрен комитетом по этике Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Применяемый протокол соответствует российскому законодательству, регулирующему проведение научных исследований с использованием лабораторных животных.

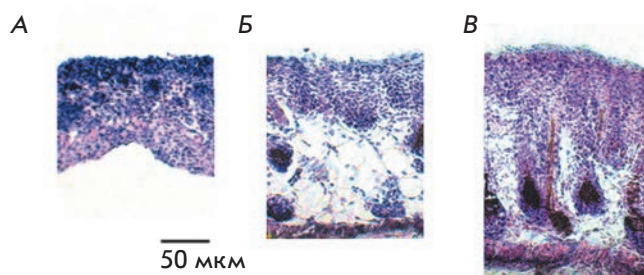
#### Культивирование клеток

Клетки NaCaT культивировали в среде DMEM, обогащенной L-глутамином, содержавшей 10% эмбриональной сыворотки теленка («ПанЭко», Россия) и 1% раствора антибиотика – антимикотика (Life Technologies, США).

#### Получение трехмерной модели кожи мыши

Трехмерную модель эпидермиса мыши получали с использованием лишенной клеток дермы и первичных кератиноцитов мыши. Для приготовления дермальной основы образцы кожи животных подвергали термообработке в PBS (56°C, 10 мин), после чего отделяли эпидермис от дермы [7]. Для создания изолированных отсеков для роста клеток на внешнюю поверхность полученных препаратов устанавливали стеклянные кольца, которые вдавливали в дерму. Клетки пересевали из расчета  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали в свежеприготовленной смеси DMEM и F12 в соотношении 3 : 1. Помимо этого в среду для культивирования добавляли эмбриональную сыворотку теленка (5% от общего объема среды), раствор антимикотика (1%), L-глутамин (4 мМ, «ПанЭко», Россия), аденин (25 мкг/мл), аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), трийодтиронин (1 мкг/мл), гидрокортизон (1 мкМ, Sigma-Aldrich, США) и рекомбинантный инсулин мыши (0.2 мкМ, R&D Systems, США). Среду заменяли каждый второй день. Через 24 ч в среду добавляли эпидермальный фактор роста (10 нг/мл, R&D Systems, США). На третий день после начала эксперимента кольца удаляли, а образцы погружали в среду. На шестой день культивирование продолжали на границе фаз, т.е. таким образом, чтобы верхняя поверхность образцов находилась в контакте с воздухом. Для последующего культивирования в среду дополнительно добавляли L-серин (1 мг/мл), L-карнитин (2 мкг/мл), ара-





**Рис. 1.** Гистологический анализ наиболее репрезентативных образцов ТММЭ после их обработки провоспалительными цитокинами. Образцы ТММЭ культивировали в течение 2 недель и обрабатывали цитокинами после 9 полных дней культивирования. А – контрольный образец без обработки цитокинами; В – образец, обработанный комбинацией ФНО и ИФНГ; В – образец, обработанный ИЛ-17 ( $n = 6$ ). Образцы использовали для приготовления парафиновых блоков и последующего окрашивания гематоксилином и эозином. Детальное описание процедур представлено в разделе «Экспериментальная часть»

хидоновую (7 мкМ) и линолевую кислоты (15 мкМ, Sigma-Aldrich, США). Витамин Е (Sigma-Aldrich, США) в количестве 0.5 мкг/мл добавляли непосредственно перед сменой среды. Образцы обрабатывали провоспалительными цитокинами, начиная с десятого дня культивирования, каждый второй день, в течение четырех дней. Для работы использовали следующие цитокины: ФНО (25 нг/мл), ИФНГ (25 нг/мл) и ИЛ-17А (50 нг/мл) производства R&D Systems (США).

### Выделение РНК

РНК выделяли тризольным методом как описано ранее [8]. Если соотношение поглощений водных растворов хотя бы одного препарата при длинах волн 260 и 280 нм не превышало 2.0, все препараты данной серии очищали с использованием набора реагентов RNeasy (Qiagen, Германия). Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле в неденатурирующих условиях.

### Проведение количественной ПЦР

Полученные образцы РНК были использованы для синтеза кДНК с применением набора реагентов MMLV RT («Евроген», Россия). Амплификацию проводили методом количественной ПЦР с использованием специфических флуоресцентных зондов (Life Technologies, США) на установке Eco (Illumina, США). Результаты анализировали при помощи программного продукта Eco, предоставленного производителем прибора.

### Проведение гистологического анализа

Для проведения гистологического анализа получали парафиновые блоки. Срезы ткани окрашивали гематоксилином и эозином.

### Статистический анализ

Статистическую значимость полученных результатов проверяли методом дисперсионного анализа, а также с применением  $t$ -теста. Значимыми считали различия при  $p < 0.05$ . Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Трехмерная модель мышинного эпидермиса (ТММЭ), полученная в нашей лаборатории (рис. 1А), слабо структурирована. В отличие от нормального эпидермиса человека, в ней отсутствует гранулярный слой клеток и слабо выражена разница между базальным и супрабазальными слоями. Корнификация также выражена слабо и представлена 2–3 верхними слоями клеток. В полученных биопсиях в незатронутой болезнью коже (рис. 2А), напротив, хорошо заметен базальный слой кератиноцитов, который непосредственно примыкает к базальной мембране. Обычно это единственный слой клеток эпидермиса, где клетки могут делиться. В супрабазальных слоях кожи кератиноциты постепенно меняют форму и начинают последовательно синтезировать маркеры терминальной дифференцировки. Гранулярный слой отделяет ороговевшие клетки, лишенные ядер, от живых клеток супрабазального слоя (рис. 2В). В псориазных бляшках (рис. 2В) эпидермис существенно утолщен, поскольку пролиферация клеток распространяется на супрабазальный слой и меняется сама программа дифференцировки кератиноцитов. Например, изменениям подвергается синтез специфических биомаркеров, образование в цитоплазме кератогиалиновых гранул, а также деградация клеточных ядер и десмосом. Примечательно, что полученная нами экспериментальная модель изначально (до обработки провоспалительными цитокинами) по своей структуре напоминает скорее эпидермис больного псориазом, чем эпидермис здоровой кожи.

Сравнение профилей экспрессии эпидермальных цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов в образцах ТММЭ и кожи новорожденных мышат позволяет говорить о сопоставимом уровне экспрессии *krt1*, *krt5*, *krt14* (рис. 3). Напротив, уровень экспрессии *krt10* и *krt18* снижен в ТММЭ, а уровень экспрессии *krt16* – в коже мышат. Помимо этого, в ТММЭ повышен уровень экспрессии *ivl*, а уровень экспрессии *lor* меняется незначительно.

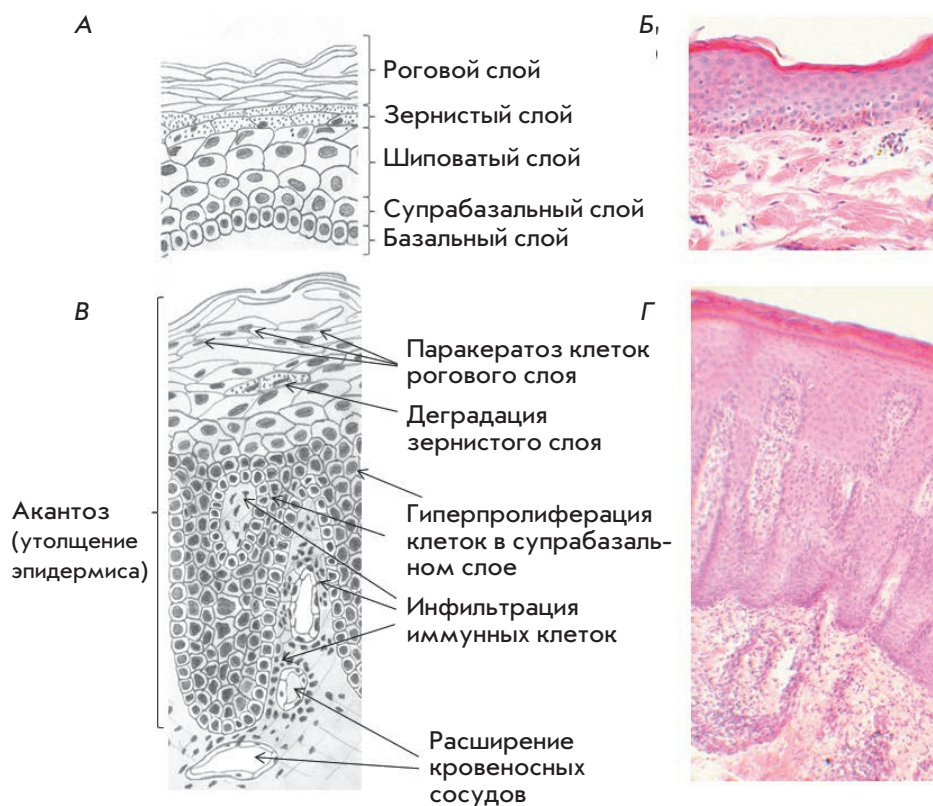


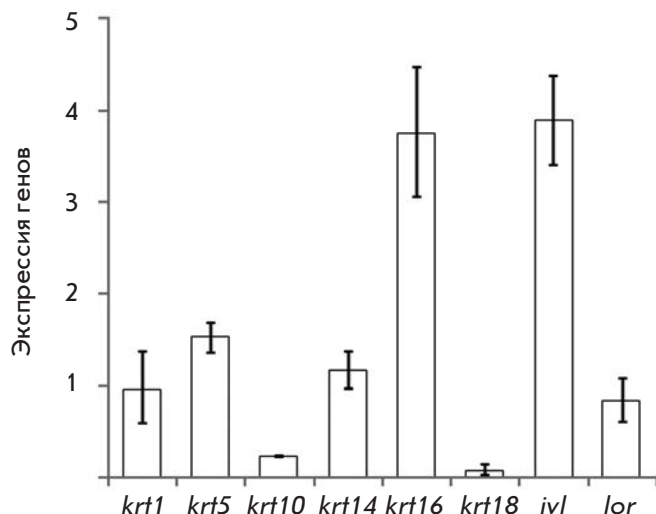
Рис. 2. Схема и гистологический анализ эпидермиса больного псориазом. Для гистологического анализа использовали образцы кожи больного в парафине после их окрашивания гематоксилином и эозином как описано в «Экспериментальной части». А – схема визуально нормального участка эпидермиса больного; Б – участок визуально нормального эпидермиса больного, окрашенный эозином и гематоксилином; В – схема пораженного участка эпидермиса больного; Г – пораженный участок кожи больного, окрашенный эозином и гематоксилином

Обработка ТММЭ провоспалительными цитокинами ФНО и ИФНГ приводит к увеличению толщины слоя живых клеток примерно в 1.5 раза относительно необработанных образцов (рис. 4). При этом видимой корнификации в верхнем слое клеток не происходит (рис. 1Б). Распределение клеток в нижних слоях ТММЭ становится менее плотным, а структура ткани – более хрупкой. Последнее обстоятельство осложняет получение неповрежденных срезов ТММЭ для гистологического анализа. Примечательно, что после обработки ИЛ-17 изменения не так сильно выражены, как после обработки ФНО и ИФНГ (рис. 1В и рис. 4): толщина трехмерной модели достоверно меньше, чем в образцах, обработанных ФНО и ИФНГ, но превышает аналогичные показатели в контрольных образцах. Таким образом, ТММЭ, как и эпидермис больных псориазом, чувствительна к действию провоспалительных цитокинов (ФНО, ИФНГ и ИЛ-17). При этом наибольший эффект наблюдается после обработки ТММЭ комбинацией ФНО и ИФНГ.

На уровне транскрипции в ТММЭ также происходят изменения, аналогичные изменениям в коже больных: экспрессия биомаркеров псориаза, *krt16* и *fosl1*, повышена после обработки ФНО и ИФНГ (рис. 5А). Также повышается экспрессия маркера пролиферации кератиноцитов, *mki67*. Модель

воспроизводит специфический профиль экспрессии генов металлопротеиназ (*mmp1*, *mmp2*, *mmp9* и *mmp12*), характерный, как показано нами ранее, для псориаза [9]. Интересно, что обработка ИЛ-17 не приводит к статистически значимым изменениям экспрессии некоторых генов (*mki67*, *fosl1* и *krt16*) по сравнению с контролем (рис. 5Б). Таким образом, полученные нами результаты говорят в пользу того, что именно комбинация ФНО и ИФНГ вносит несравненно больший вклад в активацию кератиноцитов как при псориазе, так и в ТММЭ.

Как показано нами ранее, профили экспрессии металлопротеиназ в клетках HaCaT, обработанных одновременно ФНО и ИФНГ, аналогичны профилям в пораженной донорской коже [10]. Такие же изменения после обработки ФНО и ИФНГ наблюдаются и в ТММЭ (рис. 5А). Напротив, изменения экспрессии других биомаркеров говорят о том, что культура клеток HaCaT как предполагаемая экспериментальная модель псориаза имеет ряд принципиальных отличий от ТММЭ, которые должны учитываться в экспериментальной работе при использовании клеток данного типа. Так, в клетках HaCaT, обработанных цитокинами ФНО и ИФНГ, воспроизводятся изменения в экспрессии *krt16*, биомаркера псориаза (рис. 6А), но не воспроизводятся, в отличие от ТММЭ, изменения, вызванные обработкой ИЛ-17 (рис. 6Б). Следует

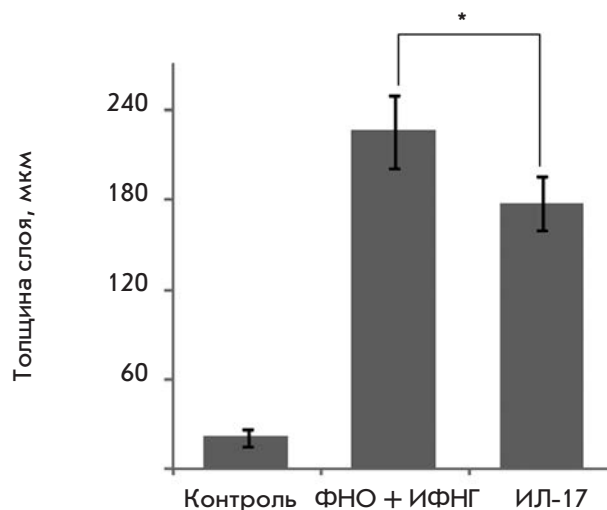


**Рис. 3.** Изменения экспрессии генов цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки кератиноцитов. Экспрессию генов цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки кератиноцитов определяли методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в обработанных образцах сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ( $n = 3$ ). Уровень экспрессии генов в необработанных образцах принимали равным 1

отметить, что экспрессия *mkib7* и *fosl1* в этих клетках не увеличивалась независимо от того, обрабатывались ли эти клетки комбинацией ФНО и ИФНГ или цитокином ИЛ-17 (рис. 6А,Б).

### ОБСУЖДЕНИЕ

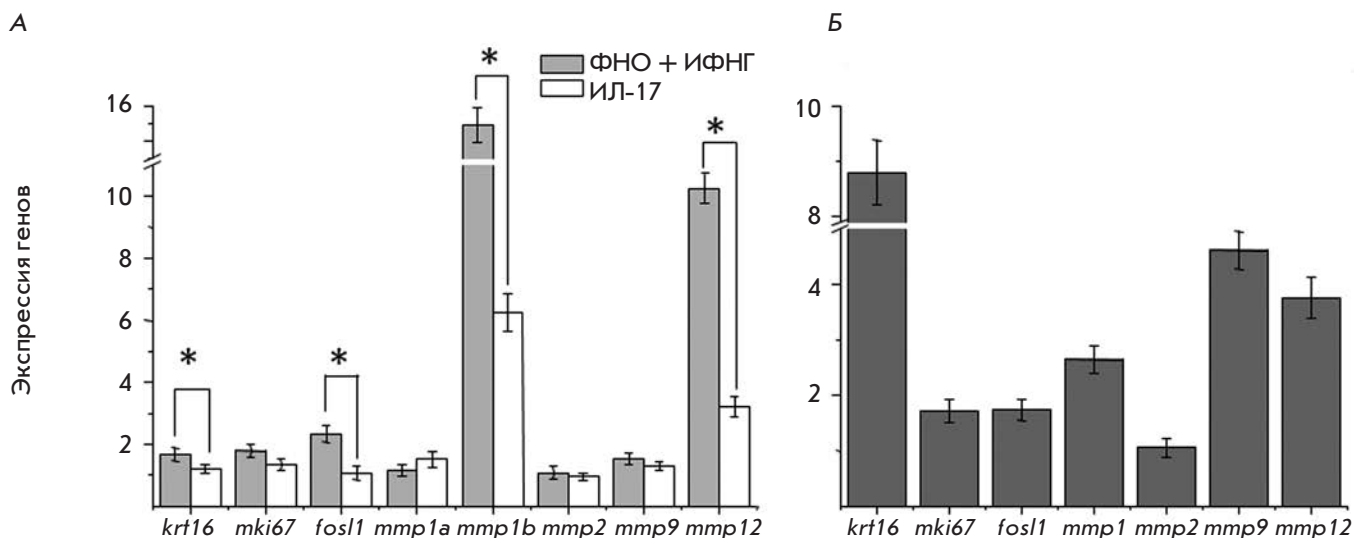
Внешние проявления псориаза являются результатом сложного многостадийного процесса, в котором участвует множество сигнальных путей и различные типы клеток. Моделирование патологических изменений кожи при псориазе позволит определить круг молекулярных механизмов, вовлеченных в патогенез болезни, и установить их связь с конкретными клиническими признаками. В последнее время появляется все больше работ, посвященных разработке трехмерных моделей кожи и эпидермиса человека. В большей степени данное направление востребовано при лечении повреждений кожных покровов. Среди работ российских ученых мы хотели бы отметить разработку клеточных моделей с использованием эндопротезной сеточки [11] и полимерных матриц на основе природных и биodeградируемых материалов, таких, как хитин и хитозан [12], полимолочная кислота [13], аморфный поли(*D,L*-лактид) и полиэтиленгликоль [14] и др. Эти разработки используют при ожогах [11] и трофических язвах [3].



**Рис. 4.** Изменения толщины образцов ТММЭ после обработки провоспалительными цитокинами. Образцы ТММЭ культивировали в течение 2 недель. Обработку провоспалительными цитокинами проводили после 9 полных дней культивирования как описано в «Экспериментальной части»

В наиболее часто применяемых трехмерных моделях кожи и эпидермиса эпидермальные кератиноциты высевают либо на содержащий фибробласты коллагеновый гель, либо на другую специальную подложку, например, на лишенную клеток дерму. Основным источником фибробластов для трехмерных моделей, применяемых в лабораторных, неклинических исследованиях, служат раковые клетки человека или мыши, предварительно  $\gamma$ -облученные или обработанные митомицином С для подавления в них митоза. В качестве источника кератиноцитов чаще всего используют кусочки человеческой кожи, оставшиеся после хирургических операций. Реже, в зависимости от специфики эксперимента, в трехмерные модели включают клетки других типов, например макрофаги [15], меланоциты [16] или дендритные клетки [17]. Особенность нашей модели как экспериментальной модели псориаза состоит в том, что в ней используются исключительно первичные кератиноциты мыши и не используются клетки человека.

Применение кератиноцитов и деэпителизированной дермы мыши в трехмерных моделях имеет целый ряд принципиальных преимуществ. Домашняя мышь – широко используемое в лабораторной практике животное, неприхотливое при содержании в неволе. Высокая плодовитость (6–8 и более мышат в одном выводке) и короткая беременность (18.5 дней) мышей позволяют снизить зависимость экспериментаторов от донорской кожи. Выбрав для своего ис-



**Рис. 5.** Изменения экспрессии генов в ТММЭ после обработки провоспалительными цитокинами (А) и в коже больных псориазом (Б). ТММЭ обрабатывали либо комбинацией ФНО и ИФНГ, либо ИЛ-17. Из соответствующих образцов выделяли РНК и проводили синтез кДНК. кДНК анализировали методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в образцах ТММЭ, обработанных цитокинами, сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ( $n = 3$ )

следования кожу новорожденных мышат, мы рассчитывали увеличить выход при выделении клеток, поскольку толщина мышинного эпидермиса существенно уменьшается в первые дни жизни мышат.

Существуют несколько типов экспериментальных моделей псориаза, в которых используются генетически модифицированные, т.е. трансгенные мыши [18] и животные с делециями в определенных генах [19]. Кроме этого, имеются экспериментальные модели, в которых характерные особенности псориаза вызваны спонтанными мутациями в геноме животных [20, 21] либо применением лекарственных средств [22]. По мере развития такие модели позволят добиться точного соответствия с клиническими проявлениями псориаза у людей [18, 22].

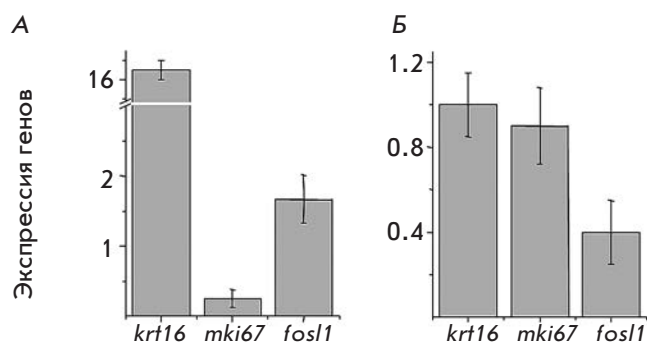
Получение и дальнейшее совершенствование ТММЭ полностью отвечает требованиям европейского законодательства, которое требует от исследователей сокращения использования лабораторных животных и скорейшего перехода к использованию клеток и тканей [4, 5]. Как показывают наши исследования, в полученной модели экспрессируются гены основных цитокератинов, вовлеченных в дифференцировку эпидермальных кератиноцитов (*krt1*, *krt5*, *krt14*). При этом уровень экспрессии этих генов сопоставим с уровнем в коже новорожденных мышат (рис. 3). Помимо генов цитокератинов экспрессируются гены *ivl* и *lor*, начало экспрессии которых предваряет процесс кератинизации. Повышенный

уровень экспрессии *ivl* и *krt16*, а также пониженный уровень *krt10* говорят об изменениях в дифференцировке клеток в процессе культивирования ТММЭ. Пониженный уровень экспрессии *krt18* указывает на большую однородность клеточного состава ТММЭ, состоящей преимущественно из эпидермальных кератиноцитов.

Сравнение ТММЭ и кожи больных позволяет сделать вывод о том, что полученная модель, как и псориазные бляшки, чувствительна к действию провоспалительных цитокинов. При этом изменения на уровне ткани, т.е. увеличение толщины слоя клеток (рис. 4) и отсутствие кератинизации во внешнем слое (рис. 1А–В), дополняются индукцией характерных для псориаза генов – генов металлопротеиназ, *mki67*, цитокератина, *krt16*, и ядерного белка, *fosl1* (рис. 5А). Зафиксированные нами гистологические изменения в модели (рис. 1А–В) напоминают акантоз (рис. 2В), а изменения профилей экспрессии генов (рис. 5А) аналогичны изменениям в коже больных псориазом (рис. 5Б).

При выборе генов для экспериментальной характеристики модели мы руководствовались их вкладом в патогенез болезни. Так, ММР1, ММР9 и ММР12 участвуют в структурной перестройке эпидермиса при псориазе [9]. Экспрессия и активация этих металлопротеиназ важны для изменения состава внеклеточного матрикса и базальной мембраны, роста новых сосудов и миграции клеток, например иммун-





**Рис. 6.** Изменения экспрессии генов в клетках HaCaT, обработанных провоспалительными цитокинами. Культуры клеток HaCaT, достигшие 70% монослоя, обрабатывали провоспалительными цитокинами либо комбинацией ФНО и ИФНГ (А), либо ИЛ-17 (Б). Из образцов выделяли РНК и получали кДНК. кДНК анализировали методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в обработанных образцах сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ( $n = 3$ )

ных клеток. Нарушение баланса между металлопротеиназами в коже больного псориазом указывает на обострение болезни. Увеличение экспрессии гена *mki67* говорит о гиперпролиферации кератиноцитов [23]. Повышенная экспрессия *mki67* также является одним из наиболее характерных признаков поврежденной псориазом кожи [24]. В коже больных псориазом повышен уровень цитокератина 16 (рис. 5Б). При этом в коже здоровых людей ген *krt16* экспрессируется на очень низком уровне [25]. Наконец, по изменению экспрессии *fosl1* можно судить об эффективности курса терапии. Экспрессия *fosl1* возрастает при обострении болезни и снижается при наступлении ремиссии [26].

Любопытно, что после обработки ИЛ-17 изменения профиля экспрессии генов становятся менее выраженными (рис. 5А). Экспрессия генов *krt16*, *mki67*, *fosl1*, *mmp1a*, *mmp2* и *mmp9* изменяется не более чем в 1.5 раза по сравнению с экспрессией в необработанных цитокинами образцах, и только у двух других генов – *mmp1b* и *mmp12* – остается на сравнительно высоком уровне.

Примечательная особенность приведенного в работе профиля генной экспрессии – наличие у мыши двух изоформ MMP1: MMP1a и MMP1b. Гены, кодирующие эти белки, идентифицированы уже более 10 лет тому назад [27]. При этом физиологические различия между продуктами генов *mmp1a* и *mmp1b* остаются неустановленными. Оба гена входят в состав одного кластера, расположенного на хромосо-

ме 9, и обладают высокой гомологией как по отношению друг к другу, так и к *mmp1* человека [27]. Кроме этого, выявлено значительное сходство в регуляции генов *mmp1a* и *mmp1b* цитокинами и факторами роста [28]. Включение обоих генов в список предполагаемых маркеров позволило нам показать, что *mmp1a* более чувствителен к действию провоспалительных цитокинов, в то время как экспрессия *mmp1b* после обработки как комбинацией ФНО и ИФНГ, так и ИЛ-17, изменяется примерно в 1.6 раза по сравнению с контролем (рис. 5А).

В целом более точное воспроизведение профиля экспрессии генов, специфичных для псориаза, отличается предложенной нами моделью от более традиционной «двумерной» культуры клеток HaCaT (рис. 5А и 6 соответственно). Например, обработка клеток HaCaT провоспалительными цитокинами ФНО и ИФНГ подавляет экспрессию *mki67* (рис. 6А). По-видимому, это объясняется отклонением от физиологического оптимума для данного типа клеток. При этом наиболее неожиданные изменения наблюдаются после обработки клеток HaCaT цитокином ИЛ-17: экспрессия двух биомаркеров – *krt16* и *mki67* – меняется незначительно, а у *fosl1* падает до уровня более низкого, чем в контроле (необработанные клетки). Таким образом, культура клеток HaCaT менее точно описывает экспрессию биомаркеров псориаза, чем ТММЭ.

ТММЭ пока имеет ряд существенных отличий от широко используемых в настоящее время трехмерных моделей кожи человека. Например, в ТММЭ нет четкой границы при переходе от одного слоя клеток к другому, корнификация внешнего слоя клеток незначительна, а распределение клеток более диффузно. Помимо этого, в ТММЭ отсутствует гранулярный слой клеток. Хотя у нас нет однозначного объяснения данного феномена, мы предполагаем, что эти различия обусловлены тем, что эпидермис мыши, используемый нами, не полностью сформирован, и для более полного соответствия моделям из клеток человека необходимо будет внести изменения в среду культивирования ТММЭ.

Для стабилизации уровня эпидермальных ростовых факторов и цитокинов в среде предполагается дополнить модель слоем непродифференцирующихся дермальных фибробластов, предварительно обработанных митомицином С [29]. С целью предотвращения дифференцировки эпидермальных кератиноцитов на начальном этапе культивирования мы планируем использовать ингибиторы киназы GSK3. Ранее один из ингибиторов киназы GSK3 уже успешно использовался для получения индуцированных стволовых клеток кожи из эпидермальных кератиноцитов [30]. Наконец для улучшения корнификации верхних слоев трехмерной модели в культуральную среду будет

добавлен ИЛ-1 или онкостатин М. Эти факторы будут применены на позднем этапе культивирования. Как показано ранее, ИЛ-1 и онкостатин М обладают способностью индуцировать гены белка S100A, а также стимулируют экспрессию генов *Tgm1* и *Ivl*, кодирующих маркеры дифференцировки кератиноцитов – трансглутаминазу и инволюкрин [31, 32].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами исследования подтверждают возможность использования трехмерной модели эпидермиса мыши для изучения псориаза.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что комбинация ИФНГ и ФНО вносит, по-видимому, большой вклад в активацию кератиноцитов мыши, чем ИЛ-17. ●

*Работа поддержана Министерством науки и образования Российской Федерации (грант № 16.512.11.2049), федеральной программой «От фундаментальной науки к медицине» и специальной программой «Научный и педагогический потенциал инновационной России» (грант № Р1309).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kolbe L., Mann T., Gerwat W., Batzer J., Ahlheit S., Scherner C., Wenck H., Stab F. // J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. 2013. V. 27. S1. P. 19–23.
- Васильев А.В., Воротеляк Е.А., Кисилев И.В., Терских В.В. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2008. № 2. С. 45–53.
- Мельцова А.Ж., Гриценко В.В., Орловский П.И., Томсон В.В., Сабельников В.В., Шулепова Е.К., Прокопец А.И., Пинаев Г.П., Блинова М.И., Юдинцева Н.М. // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2007. Т. 166. № 1. С. 72–77.
- Kandarova H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B., Spielmann H. // Altex. 2004. V. 21. № 3. P. 107–114.
- Mun G.C., Aardema M.J., Hu T., Barnett B., Kaluzhny Y., Klausner M., Karetsky V., Dahl E.L., Curren R.D. // Mutat. Res. 2009. V. 673. № 2. P. 92–99.
- Johnson-Huang L.M., Lowes M.A., Krueger J.G. // Dis. Model Mech. 2012. V. 5. № 4. P. 423–433.
- Tjabringa G., Bergers M., van Rens D., de Boer R., Lamme E., Schalkwijk J. // Am. J. Pathol. 2008. V. 173. № 3. P. 815–823.
- Chomczynski P., Mackey K. // BioTechniques 1995. V. 19. № 6. P. 942–945.
- Стародубцева Н.Л., Соболев В.В., Соболева А.Г., Николаев А.А., Брускин С.А. // Генетика. 2011. Т. 47. № 9. С. 1254–1261.
- Стародубцева Н.Л., Миннибаев М.Т., Соболева А.Г., Корсунская И.М., Кривошапов Л.Г., Елкин А.М., Яковенко Г.Т., Пирузян А.Л., Брускин С.А., Соболев В.В. // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2011. Т. 2. № 15. С. 38–41.
- Смирнов С.В., Кшелев И.В., Васильев А.В., Терских В.В. // Хирургия. 2003. № 12. С. 58–62.
- Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А., Бочек А.М., Гофман И.В., Баклагина Ю.Г. Сапрыкина Н.Н., Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Спичкина О.Г. и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5. № 1. С. 65–73.
- Швед Ю.Л., Кухарева Л.В., Зорин И.М., Соловьев А.Ю., Блинова М.И., Билибин А.Ю., Пинаев Г.П. // Цитология. 2006. Т. 48. № 2. С. 161–168.
- Швед Ю.А., Зорин И.М., Пинаев Г.П., Билибин А.Ю. // Физикохимия полимеров: синтез, свойства и применение. 2009. № 15. С. 175–179.
- Linde N., Gutschalk C.M., Hoffmann C., Yilmaz D., Mueller M.M. // PloS One. 2012. V. 7. № 7. e40058.
- Souto L.R., Vassallo J., Rehder J., Pinto G.A., Puzzi M.B. // Sao Paulo Med. J. 2009. V. 127. № 1. P. 28–33.
- Uchino T., Takezawa T., Ikarashi Y. // Toxicol. in vitro. 2009. V. 23. № 2. P. 333–337.
- Nakajima K., Kanda T., Takaishi M., Shiga T., Miyoshi K., Nakajima H., Kamijima R., Tarutani M., Benson J.M., Elloso M.M., et al. // J. Immunol. 2011. V. 186. № 7. P. 4481–4489.
- Schonthaler H.B., Huggenberger R., Wculek S.K., Detmar M., Wagner E.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 50. P. 21264–21269.
- Liang Y. // Patholog. Res. Int. 2011. № 936794.
- Wang Z., Sokolovska A., Seymour R., Sundberg J.P., Hogenesch H. // PloS One. 2012. V. 7. № 2. e31809.
- van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S., Kant M., Boon L., Laman J.D., Cornelissen F., Mus A.M., Florencia E., Prens E.P., et al. // J. Immunol. 2009. V. 182. № 9. P. 5836–5845.
- Fransson J., Hammar H. // Arch. Dermatol. Res. 1992. V. 284. № 6. P. 343–348.
- Rikimaru K., Moles J.P., Watt F.M. // Exp. Dermatol. 1997. V. 6. № 5. P. 214–221.
- Iizuka H., Takahashi H., Honma M., Ishida-Yamamoto A. // J. Dermatol. 2004. V. 31. № 4. P. 271–276.
- Серов Д.Н., Соболев В.В., Потеева Н.Н., Пирузян Е.С., Корсунская И.М., Абдеева И.А., Соболева А.Г., Золотаренко А.Д., Миннибаев М.Т. // Клиническая дерматология и венерология. 2010. № 4. С. 4–9.
- Balbin M., Fueyo A., Knauper V., Lopez J. M., Alvarez J., Sanchez L. M., Quesada V., Bordallo J., Murphy G., Lopez-Otin C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 13. P. 10253–10262.
- Hyc A., Osiecka-Iwan A., Niderla-Bielinska J., Moskalewski S. // Int. J. Mol. Med. 2011. V. 27. № 1. P. 127–137.
- Huang Y.C., Wang T.W., Sun J.S., Lin F.H. // Artif. Organs. 2006. V. 30. № 3. P. 150–159.
- Li Z., Rana T.M. // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 1085.
- Yano S., Banno T., Walsh R., Blumenberg M. // J. Cell. Physiol. 2008. V. 214. № 1. P. 1–13.
- Gazel A., Rosdy M., Bertino B., Tornier C., Sahuc F., Blumenberg M. // J. Invest. Dermatol. 2006. V. 126. № 12. P. 2647–2657.

УДК 577.15:616.379-008.64

# Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина

Т. Н. Попова, А. А. Агарков, А. Н. Вережкин\*

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

\*E-mail: wer.all@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2013

**РЕФЕРАТ** Проведено исследование влияния эпифамина на интенсивность свободнорадикальных процессов, активности каспаз-1 и -3, аконитатгидратазы и на содержание цитрата в печени крыс при экспериментально индуцированном сахарном диабете 2 типа (СД2). Установлено, что под действием эпифамина при СД2 происходит изменение параметров биохемилюминесценции, соответствующее снижению интенсивности свободнорадикальных процессов, а также изменение активности аконитазы и содержания цитрата в сторону значений, характерных для контрольных животных. Активности каспазы-1 и каспазы-3 в печени крыс с СД2, которым вводили эпифамин, были соответственно в 2.4 и 1.6 раза ниже, чем в отсутствие эпифамина. По-видимому, эпифамин-опосредованная коррекция свободнорадикального гомеостаза при СД2 связана с регуляцией уровня мелатонина – гормона, обладающего выраженной антиоксидантной активностью.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** сахарный диабет 2 типа, биохемилюминесценция, аконитатгидратаза, цитрат, каспаза, эпифамин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АГ – аконитатгидратаза; АФК – активные формы кислорода; БХЛ – биохемилюминесценция; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет является одним из социально значимых заболеваний и остается актуальной проблемой как для медицинской науки, так и для здравоохранения. Среди всех случаев данной патологии более 90% приходится на СД2.

В патогенезе осложнений СД2 существенная роль принадлежит свободнорадикальному окислению биомолекул. Скорость образования свободных радикалов при СД2 зависит от скорости гликозилирования белков, а следовательно, и от степени гипергликемии [1]. Одной из причин усиления свободнорадикальных процессов при СД2 может являться активация полиолового шунта, функционирование которого связано с превращением глюкозы в сорбитол с участием альдозоредуктазы. В условиях гипергликемии свободные радикалы также образуются в процессе аутоокисления глюкозы при формировании конечных продуктов гликозилирования, которые, в свою очередь, участвуют в патогенезе ангиопатий, способствуют нарастанию ишемии и интенсификации свободнорадикальных процессов в тканях при СД2 [1]. Усиление гликозилирования гемоглобина приводит к вторичной тканевой гипоксии [2].

Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при СД2 может являться причиной акти-

вации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, характеризующегося активацией каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз, известных как каспазы. Каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз, специфически расщепляющих белки после остатков аспарагиновой кислоты [3]. В частности, с участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК (CAD). Каспазы вызывают также гидролиз белков ламинов, армирующих ядерную мембрану, что ведет к конденсации хроматина. Они участвуют в разрушении белков, поддерживающих структурно-функциональное состояние цитоскелета, а также в инактивации и нарушении регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК и репликации ДНК. При этом ключевой каспазой является каспаза-3 (crr32), и оценка активности каспазы-3 – один из основных методов определения уровня апоптоза в ткани [4]. Кроме того, важной характеристикой процесса апоптоза является активность каспазы-1 (ICE), относящейся к группе каспаз-активаторов цитокинов.

Известно, что одна из чувствительных мишеней действия свободных радикалов – это аконитатгидратаза (АГ), выполняющая основную роль в регуляции накопления цитрата [5]. Показано, что в условиях

активации свободнорадикального окисления регуляция активности АГ претерпевает существенные изменения, происходит угнетение активности фермента и накопление цитрата, являющегося низкомолекулярным антиоксидантом вследствие хелатирующих свойств по отношению к ионам  $Fe^{2+}$  [6]. Ионы  $Fe^{2+}$ , как известно, обладают прооксидантной активностью, так как, участвуя в реакциях Фентона и Хабера–Вайса, приводят к образованию одной из наиболее агрессивных и опасных активных форм кислорода (АФК) – гидроксильного радикала [7].

Актуальным является применение препаратов, способных снижать интенсивность свободнорадикальных процессов в организме. Препарат эпифамин – пептидный биорегулятор, тропный к эпителиально-эпифизарной области. Он относится к классу цитомединов. Эти пептиды не только оказывают положительное действие на иммунную систему, нормализуют жировой и углеводный обмен, но также способны осуществлять коррекцию уровня эндогенного мелатонина [8, 9]. Один из основных биохимических механизмов действия мелатонина на клетки – антиоксидантный. Мелатонин является активным донором электронов, а также эффективным перехватчиком радикалов:  $OH\cdot$ ,  $OOH\cdot$ ,  $O_2^{\cdot-}$ , синглетного кислорода,  $NO\cdot$ ,  $ONOO^-$  [10]. В отличие от большинства других внутриклеточных антиоксидантов, локализующихся преимущественно в определенных клеточных структурах, присутствие мелатонина и, следовательно, его антиоксидантная активность определены во всех клеточных структурах, включая ядро [11]. Этот факт свидетельствует об универсальности антиоксидантного действия мелатонина, а также выраженных протективных свойствах, обеспечивающих защиту от свободнорадикального повреждения ДНК, белков и липидов.

В данной работе проведено исследование влияния эпифамина на интенсивность свободнорадикальных процессов, активности каспаз-1 и -3, аконитатгидратазы и на содержание цитрата в печени крыс с экспериментальным СД2.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150–200 г. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с санитарными правилами для вивария. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамина сульфата в течение 3 недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0.5 мл 0.9% NaCl 3 раза в сутки [12].

В ходе эксперимента животные были разделены на три группы: группу 1 ( $n = 8$ ) составляли контроль-

ные животные; группу 2 ( $n = 8$ ) – животные с СД2; в группе 3 ( $n = 8$ ) животным с СД2 внутривенно вводили эпифамин в виде раствора в 1 мл 0.9% раствора NaCl трижды в день в дозе 2.5 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента. Через 3 недели после начала индуцирования СД2 наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и использовали для дальнейших исследований. Для извлечения печени крысам под наркозом производили лапаротомию, затем под портальную вену подводили лигатуру, надсекали и канюлировали ее на 10 мм ниже синуса, переднюю полую вену пересекали в диафрагмальной области и перфузировали печень ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску ткани гомогенизировали путем растирания ткани в фарфоровой ступке с кварцевым песком в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения. Среда имела следующий состав: 0.1 М Трис-НСl-буфер (pH 7.8), содержащий 1 mM EDTA и 1%  $\beta$ -меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

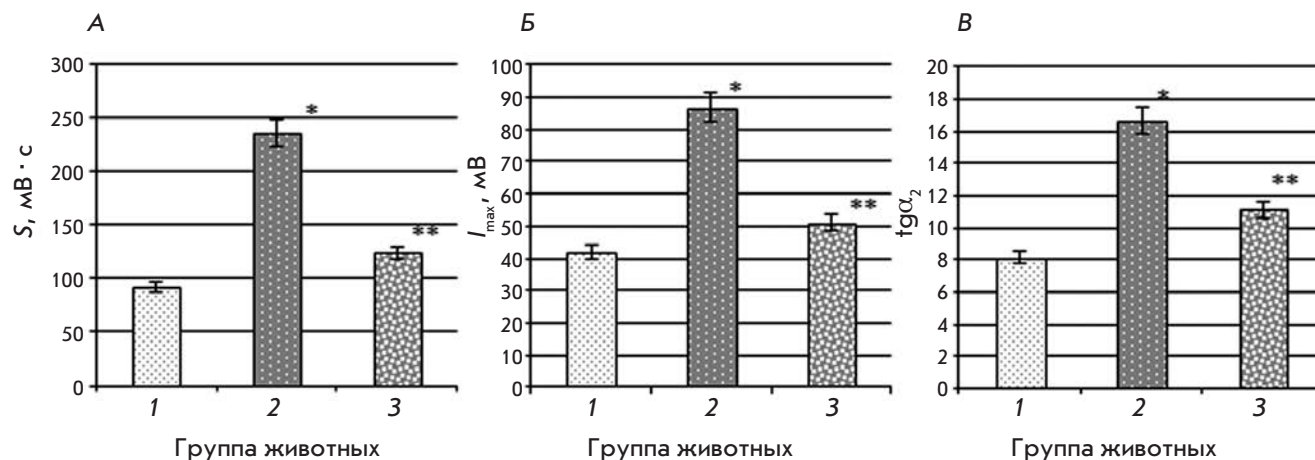
Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов «ГЛЮКОЗА-12-ВИТАЛ» (производитель ООО «Витал-Диагностикс», СПб., Россия). Пробы крови брали из хвостовой вены на 15, 17 и 19 день эксперимента [13]. Сыворотку получали кратковременным центрифугированием.

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов применяли метод индуцированной биохемилюминесценции (БХЛ) [14]. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции ( $S$ ), соответствующую площади под кривой хемилюминесценции; интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ) – максимальное значение на кривой биохемилюминесценции, характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, а также величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода БХЛ ( $tg\alpha_2$ ), характеризующую общую антиоксидантную активность.

Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0.4 мл 0.02 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.5), 0.4 мл 0.01 mM  $FeSO_4$  и 0.2 мл 2% раствора пероксида водорода (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0.1 мл непосредственно перед измерением до внесения пероксида водорода.

Определение активности каспаз-1 и -3 проводили с помощью набора реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric соответственно (Sigma) на спектрофотометре Hitachi





**Рис. 1.** Параметры биофлуоресценции: светосумма медленной вспышки ( $S$ ) (А), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ) (Б), тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой хода биофлуоресценции ( $tg\alpha_2$ ) (В) в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при  $p \leq 0.05$ : \* – по сравнению с контрольной группой, \*\* – по сравнению с группой с СД2

U1900 с программным обеспечением. Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Тур-Val-Ala-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-YVAD-pNA) (в случае каспазы-1) и ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-DEVD-pNA) (в случае каспазы-3) с образованием *n*-нитроанилина, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения = 10.5). Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

Активность АГ определяли на спектрофотометре Hitachi U1900 при длине волны 233 нм. О скорости дегидратации цитрата в ходе АГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате образования двойной связи в молекуле *цис*-аконитата. Определение активности АГ проводили в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.8, содержащем 0.15 мМ цитрат. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C.

Количество цитрата определяли по методу Нательсона [15]. В основе метода лежит реакция бромирования цитрата в присутствии перманганата калия с образованием пентабромацетона, который образует окрашенный комплекс с тиомочевинной. Интенсивность окраски этого соединения измеряли спектрофотометрически при длине волны 430 нм на спектрофотометре Hitachi U1900. Расчет производили по калибровочной кривой.

Общий белок определяли биуретовым методом. Статистическую достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что введение протамина сульфата экспериментальным животным приводило к увеличению содержания глюкозы в сыворотке крови. Использование эпифамина в качестве протектора способствовало снижению уровня гипергликемии у крыс с экспериментально индуцированным СД2: на 19 сут после начала эксперимента содержание глюкозы в крови у животных с СД2, получавших эпифамин, было в 1.8 раза ниже, чем у больных животных, не получавших эпифамин (таблица). Это может быть связано со способностью эпифамина увеличивать уровень мелатонина в организме. Как известно, мелатонин способен стимулировать транспорт глюкозы в скелетные мышцы, активируя IRS-1/PI-3-киназный путь, в результате чего снижается содержание глюкозы в крови [16].

Согласно полученным данным, значения светосуммы БХЛ ( $S$ ) и интенсивности максимальной вспышки БХЛ ( $I_{max}$ ) в печени крыс с СД2 в 2.6 и 2.1 раза превышали соответствующие показатели у контрольных животных (рис. 1А, Б), что свидетельствует о возрастании интенсивности свободнорадикального окисления. Согласно данным литературы, при СД2 имеет место активация полиолового пути, в котором глюкоза превращается в сорбитол с участием альдозо-

Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс экспериментальных групп животных на 15, 17 и 19 день эксперимента

Группа животных	Концентрация глюкозы, мМ		
	15 день	17 день	19 день
1 (контроль)	5.00 ± 0.24	5.26 ± 0.23	5.5 ± 0.26
2	9.02 ± 0.41	9.72 ± 0.43	13.74 ± 0.64
3	8.18 ± 0.38	7.92 ± 0.36	7.71 ± 0.34

редуктазы. Под действием сорбитолдегидрогеназы сорбитол превращается во фруктозу, что сопровождается увеличением соотношения NADH/NAD<sup>+</sup>, как и при развитии тканевой гипоксии. Данное состояние получило название «редуктивный стресс», или «гипергликемическая псевдогипоксия» [2]. Следствием данного состояния может быть изменение степени восстановленности компонентов электрон-транспортной цепи, приводящее к повышению вероятности образования АФК.

В печени животных с СД2 выявлено также увеличение в 2.1 раза по сравнению с контрольными животными значения tgα<sub>2</sub> – параметра БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность (рис. 1В). Введение эпифамина крысам с СД2 приводило к снижению значений S и I<sub>max</sub> в печени в 1.9 и 1.7 раза соответственно (рис. 1А,Б). Регистрируемое снижение уровня свободнорадикального окисления может быть результатом проявления антиоксидантных свойств мелатонина, уровень которого способен регулировать эпифамин. Согласно литературным данным, мелатонин может взаимодействовать с рядом активных кислородных метаболитов, в частности,

нейтрализовать гидроксильный радикал – одну из самых реакционноспособных АФК [10, 17].

Кроме того, у животных с СД2, получавших эпифамин, значения tgα<sub>2</sub> были в 1.5 раза ниже, чем у больных животных, не получавших эпифамина. Это, очевидно, связано с уменьшением степени мобилизации антиоксидантной системы вследствие торможения свободнорадикальных процессов.

Установлено, что в печени животных с экспериментальным СД2 происходит увеличение удельной активности каспазы-1 в 6.0 раза, каспазы-3 – в 2.7 раза (рис. 2). Это свидетельствует об усилении апоптотических процессов в клетках печени. Повышение активности каспазы-3 в печени крыс также отмечено при действии четыреххлористого углерода [18].

При введении эпифамина животным с СД2 наблюдалось уменьшение активности каспазы-1 в печени в 2.4 раза, каспазы-3 – в 1.6 раза по сравнению с соответствующими значениями у животных с СД2, не получавших эпифамина (рис. 2).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о снижении уровня апоптотических процессов в печени крыс с СД2 при действии эпифамина,

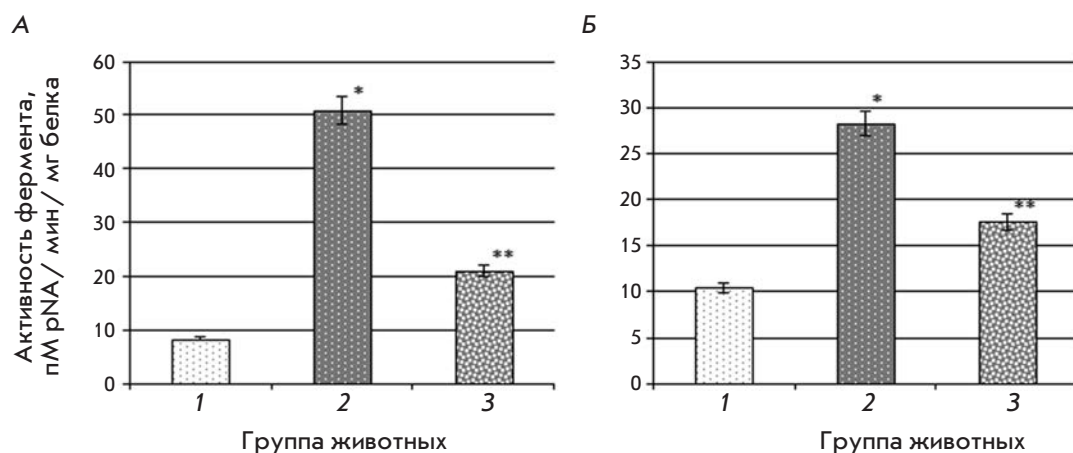
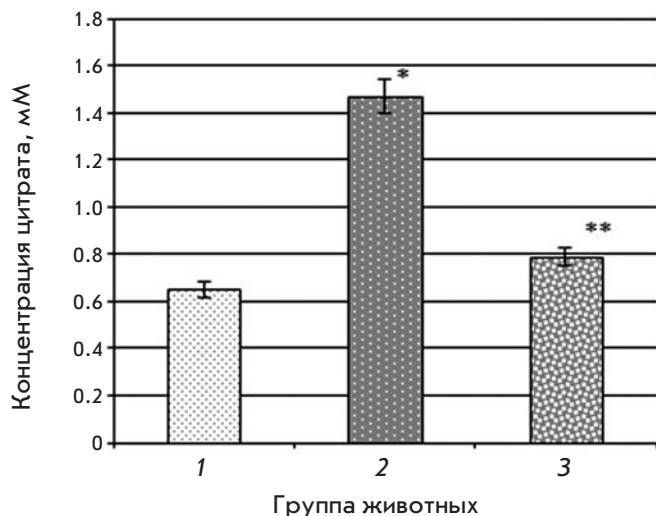


Рис. 2. Активность каспазы-1 (А) и каспазы-3 (Б) в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при  $p \leq 0.05$ : \* – по сравнению с контрольной группой, \*\* – по сравнению с группой с СД2

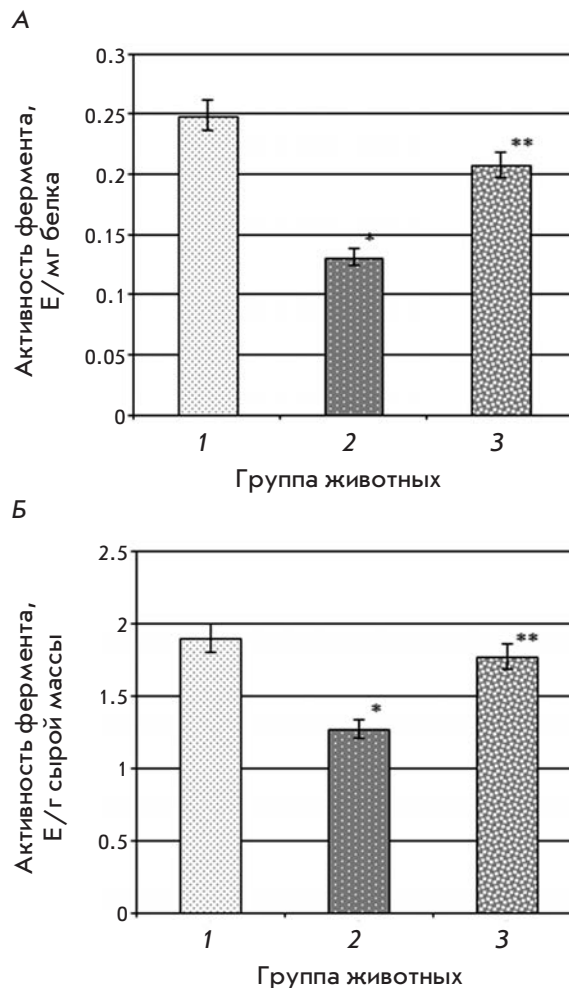


**Рис. 3.** Содержание цитрата в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при  $p \leq 0.05$ : \* – по сравнению с контрольной группой, \*\* – по сравнению с группой с СД2

что, возможно, связано со снижением скорости свободнорадикальных процессов при введении эпифамина.

Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 в печени крыс происходит увеличение содержания цитрата в 2.3 раза (рис. 3) по сравнению с контрольными значениями. Также наблюдалось снижение удельной активности аконитазы в печени животных с СД2 в 1.9 раза и активности, выраженной в виде Е/г сырой массы, в 1.5 раза относительно контроля (рис. 4). Известно, что активность АГ может служить маркером окислительного стресса, так как под действием АФК фермент теряет активность вследствие окислительной модификации активного центра и высвобождения атома железа из железосерного кластера [5]. Полученные данные об изменении активности АГ и уровня цитрата при СД2 согласуются с результатами измерения параметров БХЛ, подтверждающими, что в условиях развития СД2 наблюдается интенсификация свободнорадикального окисления.

Введение эпифамина крысам с СД2 приводило к снижению уровня цитрата в печени в 1.9 раза (рис. 3) и увеличению в 1.6 раза удельной активности АГ (рис. 4А) по сравнению с соответствующими показателями у животных с СД2, не получавших эпифамин. Активность АГ, выраженная в Е/г сырой массы печени, также увеличилась в 1.4 раза по сравнению со



**Рис. 4.** Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мг белка (А) и в Е/г сырой массы (Б), в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при  $p \leq 0.05$ : \* – по сравнению с контрольной группой, \*\* – по сравнению с группой с СД2

второй экспериментальной группой (рис. 4Б). Изменение исследуемых параметров в сторону контрольных значений при введении эпифамина животным с СД2, очевидно, свидетельствует о снижении уровня окислительного стресса, что ведет к реконструкции активного центра АГ и утилизации цитрата в катализируемой АГ реакции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на способность эпифамина оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз путем снижения степени выраженности окислительного

стресса при экспериментальном СД2 у крыс. Об этом свидетельствует изменение в сторону нормы показателей БХЛ –  $I_{\max}$  и  $S$ , характеризующих интенсивность свободнорадикальных процессов, значений  $\text{tg}\alpha_2$ , отражающих общую антиоксидантную актив-

ность; активностей каспазы-1 и каспазы-3, свидетельствующих о скорости апоптотических процессов, а также активности АГ и уровня цитрата в печени крыс с СД2. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // Проблемы эндокринологии. 2000. № 6. С. 29–34.
2. Baynes J.W., Thorpe J.W. // Diabetes. 1999. V. 48. P. 1–9.
3. Куцый М.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 149–163.
4. Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kägi D., Hakem A., McCurrach M., Khoo W., Kaufman S.A., et al. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 806–819.
5. Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12248–12252.
6. Cadet E., Gadenne M., Capron D., Rochette J. // Rev. Med. Interne. 2005. V. 26. P. 315–324.
7. Кухтина Е.Н., Глущенко Н.Н. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 6. С. 993–997.
8. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В., Попучиев В.В., Коновалов С.С. Пептидергическая регуляция гомеостаза. СПб.: Наука, 2003. 194 с.
9. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Aging interventions and therapies / Ed. Suresh I.S. Rattan. Singapore: World Scientific, 2005. P. 127–146.
10. Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C., Gitto E. // J. Biomed. Sci. 2000. V. 7. № 6. P. 444–458.
11. Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D., Tan D.X., Burkhardt S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. V. 939. P. 200–215.
12. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. // Вопросы мед. химии. 2000. Т. 46. № 2. С. 149–154.
13. Богомолов А.Ф., Лукьянов И.Ю., Горбачева Л.Р. Методические рекомендации по курсу экспериментальной физиологии для студентов биологического отделения биологического факультета. Иваново: Ивановский гос. ун-т, 2005. 43 с.
14. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. // Биохимия и биофизика микроорганизмов: Межвузовский сб. Горький, 1983. С. 179–183.
15. Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И. // Лаб. дело. 1973. № 4. С. 115–116.
16. Ha E., Yim S.V., Chung J.H., Yoon K.S., Kang I., Cho Y.H., Baik H.H. // J. Pineal Res. 2006. V. 41. № 1. P. 67–72.
17. Peschke E. // J. Pineal Res. 2008. V. 44. № 1. P. 26–40.
18. Лемза С.В., Ажунова Т.А., Мондодоев А.Г., Николаев С.М., Разуваева Я.Г., Занданов А.О. // Бюл. ВШЦ СО РАМН. 2010. Т. 72. № 2. С. 181–184.



## 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.

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 четырех.

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](http://www.actanaturae.ru). Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала *Acta Naturae*, или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 628.

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. 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 возможность 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  $\mu$ М; нм, но не nm).

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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