

Письмо редакторов

Уважаемые читатели!
Предлагаем вашему вниманию
17-й номер журнала.

Научная часть журнала построена по уже традиционному для нас принципу – обзоры и экспериментальные статьи, охватывающие широкий диапазон проблем современной медико-биологической науки. Можно заметить, что два материала (*А.И. Шевченко и др.* и *А.В. Панова и др.*) посвящены различным аспектам инактивации X-хромосомы. Читайте публикацию этих трудов нашим откликом на широко обсуждаемый в СМИ кризис мужественности!

Обзор *Н.А. Орловой и др.* посвящен одному из наиболее удачных примеров приложения фундаментальной науки и биотехнологии к практической медицине – благодаря все расширяющемуся применению рекомбинантного фактора VIII практически неизлечимая гемофи-

лия А все в большей степени поддается контролю. А обзор *Т.Д. Лебедева и др.* касается подхода, который в будущем, возможно, также внесет существенный вклад в медицину.

Из пяти научных сообщений номера три также посвящены фундаментальным основам медицины. Диапазон применяемых подходов весьма широк, что отражает существующие тенденции.

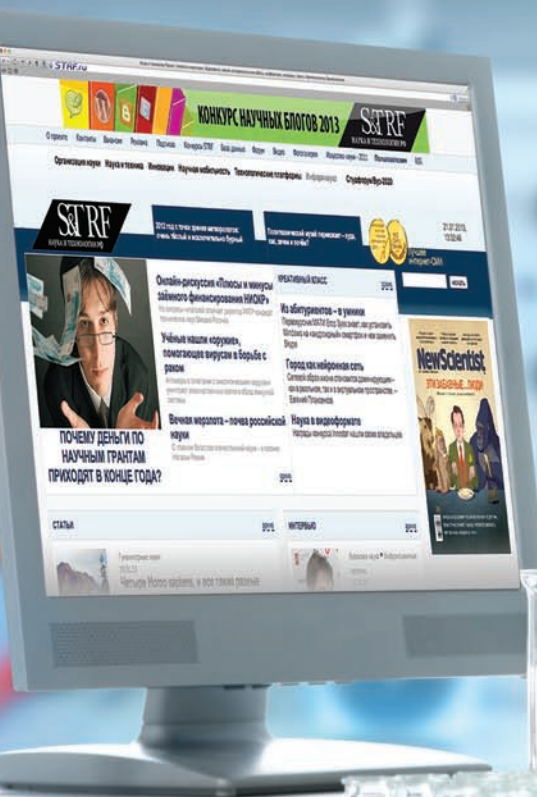
Последнее сообщение пришло к нам с Украины. Мы приветствуем наших новых авторов и надеемся, что наши, некогда, столь прочные научные и человеческие связи вновь будут укрепляться. Весьма отраднo, что количество статей из-за рубежа в нашем портфеле стабильно возрастает. Выражаем надежду, что это в большой степени результат наших стараний.

Будем стараться и далее! ●

Редакционная коллегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ

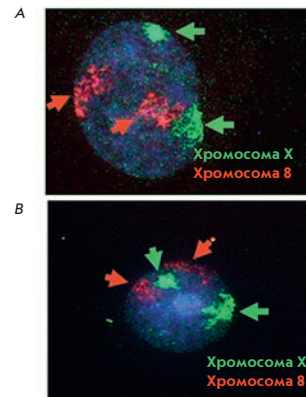


Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

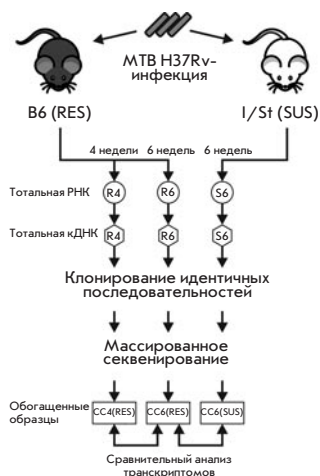
**На мобильных устройствах с диагональю менее 7"
загружается облегченная версия сайта*

Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории

А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв, А. Н. Богомазова
Показано, что плюрипотентные стволовые клетки человека с инактивированной X-хромосомой могут иметь как релаксированную, так и компактную хромосомную территорию неактивной X-хромосомы. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории. Для перехода X-хромосомы к активному состоянию при ее реактивации и для синхронной репликации необходимым условием является декомпактизация хромосомной территории X-хромосомы.



Пример двух типов компактизации X-хромосом у плюрипотентных стволовых клеток человека



Общая схема эксперимента по сравнению транскриптомов *M. tuberculosis*

Транскриптом *Mycobacterium tuberculosis* при заражении мышей с разной генетической чувствительностью к инфекции

Т. А. Скворцов, Д. В. Игнатов, К. Б. Майоров, А. С. Апт, Т. Л. Ажикина
Приведены результаты анализа полногеномной экспрессии *Mycobacterium tuberculosis* при персистенции в тканях легкого инфицированного хозяина. Мышей двух линий с генетически различной чувствительностью к туберкулезу инфицировали патогенными бактериями *M. tuberculosis*. Установлено, что структура транскриптома *M. tuberculosis* при развитии инфекции указывает на активизацию липидного метаболизма, метаболизма аминокислот, переход к анаэробному дыханию, повышение экспрессии факторов модуляции иммунного ответа. Важный результат работы – выделение 209 генов, уровень экспрессии которых повышался в ходе развития инфекционного процесса в организмах хозяев обеих линий.

Особенности регуляции экспрессии генов в системе рестрикции–модификации Ecl18kI

О. Ю. Буренина, Е. А. Федотова, А. Ю. Рязанова, А. С. Проценко, М. В. Захарова, А. С. Карягина, А. С. Солонин, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева
Изучено комплексообразование С5–цитозиновой ДНК-метилтрансферазы Ecl18kI и РНК-полимеразы *Escherichia coli* с промоторными областями генов ДНК-метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции, детализирован механизм регуляции экспрессии генов в системе рестрикции–модификации Ecl18kI.

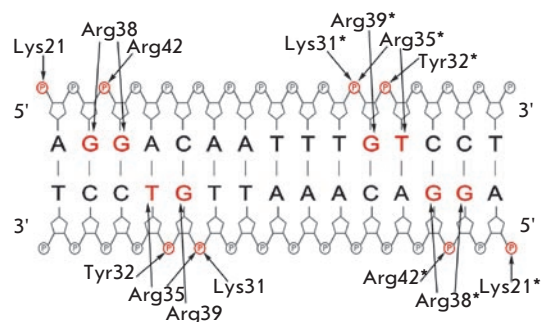


Схема контактов аминокислотных остатков димера N-концевой области *M.Soll* с регуляторным участком ДНК

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре
Издатель: А.И. Гордеев

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

Руководитель проекта: М.Н. Морозова
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Директор по стратегическому развитию:
Е.Л. Пустовалова

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

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

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 18 апреля 2013 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Включен в базу
данных PubMed

Входит в базу данных
Web of Science

Журнал *Acta Naturae* входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России.

Смотрите страницу на сайте ВАК:
http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk/list/

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

38 Конгресс Федерации европейских
биохимических обществ в России 6

ОБЗОРЫ

Т. Д. Лебедев, П. В. Спиринов, В. С. Прасолов
Перенос и экспрессия малых
интерферирующих РНК в клетках
млекопитающих с помощью
лентивирусных векторов 7

Н. А. Орлова, С. В. Ковнир, И. И. Воробьев,
А. Г. Габибов, А. И. Воробьев
Фактор свертывания крови VIII —
от эволюции к терапии 19

А. И. Шевченко, И. С. Захарова, С. М. Закиян
**Эволюционный путь процесса
 инактивации X-хромосомы
 у млекопитающих** 40

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова,
 С. Л. Киселёв, А. Н. Богомазова
**Поздняя репликация инактивированной
 X-хромосомы в плюрипотентных
 стволовых клетках человека
 не зависит от степени компактизации
 ее хромосомной территории** 55

Т. А. Скворцов, Д. В. Игнатов, К. Б. Майоров,
 А. С. Апт, Т. Л. Ажикина
**Транскриптом *Mycobacterium tuberculosis*
 при заражении мышей с разной
 генетической чувствительностью
 к инфекции** 64

О. Ю. Буренина, Е. А. Федотова, А. Ю. Рязанова,
 А. С. Проценко, М. В. Захарова, А. С. Карягина,
 А. С. Солонин, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева
**Особенности регуляции
 экспрессии генов в системе
 рестрикции—модификации *Eco18ki*** 72

В. Ф. Лазарев, Д. В. Сверчинский,
 М. В. Ипполитова, А. В. Степанова,
 И. В. Гужова, Б. А. Маргулис
**Условия агрегации мутантных
 белков в клеточных моделях болезни
 Хантингтона и амиотрофического
 бокового склероза** 83

Р. Морев, А. Васильченко, М. Платонов,
 А. Григоренко, Е. Волкова, С. Зозуля
**Идентификация новых ингибиторов
 киназной активности IGF1R методами
 молекулярного моделирования
 и высокоэффективного скрининга** 93

Правила для авторов 104

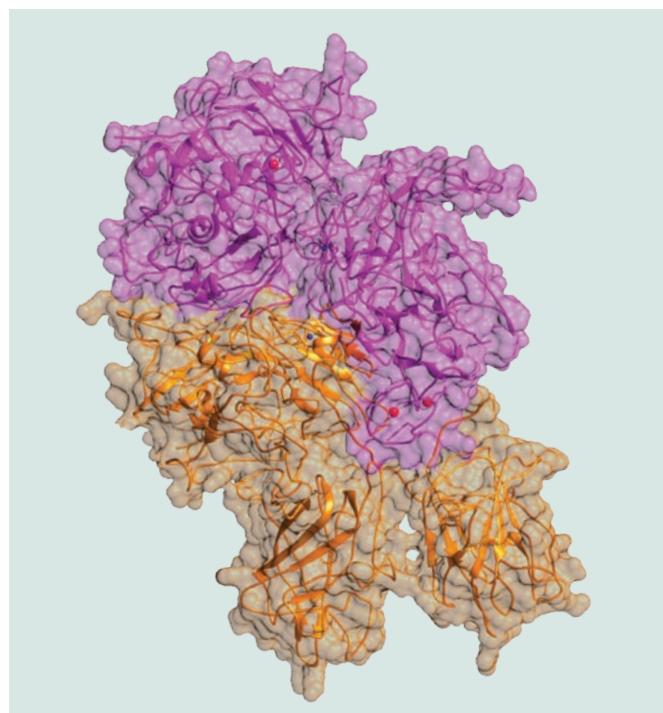


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Пространственная структура делеционного варианта FVIII

FEDERATION OF EUROPEAN
BIOCHEMICAL SOCIETIES
CONGRESS 2013
Mechanisms in Biology



Приближается лето, а с ним и крупнейший научный форум этого года в области наук о жизни FEBS-38. Мы уже писали в прошлом номере о программе Конгресса, основных пленарных докладчиках, среди которых 11 лауреатов Нобелевской премии по химии и биологии, говорили о тематике 37 симпозиумов. Прием тезисов докладов на Конгресс заканчивается 1 мая, и уже сейчас можно говорить о некоторых первых итогах регистрационного цикла делегатов. На сегодня зарегистрировалось около 2800 участников. Причем география делегатов весьма обширна. Неудивительно, что, хотя Конгресс европейский, достаточно много представителей США (96 человек), есть ученые из Японии, Китая, Египта, Индии. Безусловно, больше всего европейцев. Лидируют Великобритания, Франция и Германия. Ожидается около 1000 делегатов из России. Программа стипендиатов Конгресса (всего 170 человек) не предполагала обеспечения участия российских молодых ученых. В последние дни

оргокомитету удалось добиться понимания со стороны Минобрнауки, и изыскана возможность поддержать участие 150–170 молодых ученых из России. В настоящее время заканчивается регистрация этой группы делегатов. Как уже отмечалось, Конгресс предваряет молодежный форум, который пройдет в историческом здании Российской академии наук. Основные мероприятия Конгресса пройдут на территории Ленэкспо, а торжественное открытие запланировано в БКЗ «Октябрьский». Сейчас уже очевидно, что на Конгрессе пройдет весьма представительная выставка реактивов, материалов и оборудования для научных исследований, а также будут представлены издательства. В последние дни Минпромторгом России принято решение обеспечить представительство на выставке российских институтов и компаний, работающих над реализацией программы «Фарма 2020» и готовых поделиться результатами своих исследований, выполненных в рамках этой программы. Создастся уникаль-

ная возможность оценить этапы реализации программы с мировыми лидерами биофармацевтики и крупнейшими учеными, работающими над новыми подходами к терапии рака, аутоиммунных, нейродегенеративных заболеваний, инфекций.

В настоящее время обсуждается инициатива Минобрнауки по представлению на Конгрессе достижений лучших вузов страны в области привлечения специалистов из-за рубежа, участия наших аспирантов, студентов в международных проектах. Но, безусловно, наиболее стимулирующим будет собственно участие молодых ученых из России в Конгрессе. Четко наметилась тенденция предоставлять краткие 15-минутные доклады в конце симпозиальных сессий молодым ученым, представившим интересные тезисы своих работ. Широкое публичное обсуждение этих докладов станет, по всей видимости, ярким, запоминающимся событием, интересным как для слушателей Конгресса, так и для собственно молодого докладчика. Это будет стимулом карьерного роста молодого ученого.

Оргокомитет вынужден решать многие социальные аспекты Конгресса и, в первую очередь, недорогого жилья для молодых ученых. Благодаря усилиям молодежи Санкт-Петербургского академического университета РАН удалось найти общежития, оргкомитет предоставит данную информацию на сайте Конгресса. Уникальная культурная программа, включающая балетный спектакль на открытии после лекции Нобелевского лауреата Жюль Хоффмана и посещение Эрмитажа, будет стимулом для эффективной работы делегатов.

Приезжайте в Петербург с 6 по 11 июля! Будет очень интересно! ●

УДК 577.21

Перенос и экспрессия малых интерферирующих РНК в клетках млекопитающих с помощью лентивирусных векторов

Т. Д. Лебедев*, П. В. Спиринов, В. С. Прасолов

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

*E-mail: saint_john@list.ru

Поступила в редакцию 19.09.2012

РЕФЕРАТ РНК-интерференция является удобным инструментом, позволяющим модулировать экспрессию генов. Широкому применению РНК-интерференции мешает несовершенство методов эффективной доставки изучаемых генов в клетки-мишени. Одна из удобных и эффективных систем переноса генов и их экспрессии – система, основанная на применении лентивирусных векторов, направляющих синтез малых шпилечных РНК (shРНК) – предшественников siРНК. Использование подобных систем позволяет добиться устойчивой и долговременной экспрессии shРНК в клетках. В представленном обзоре рассмотрены такие подходы к созданию лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, как адаптация процессинга искусственных shРНК к механизмам, используемым клеточными микроРНК, и экспрессия сразу нескольких shРНК. В настоящее время активно разрабатываются подходы к применению РНК-интерференции в терапии наследственных, онкологических и вирусных заболеваний. Совершенствование методов конструирования лентивирусных векторов, а также изучение механизмов процессинга малых интерферирующих РНК позволяют рассматривать лентивирусные векторы, направляющие синтез shРНК, как один из самых перспективных инструментов доставки малых интерферирующих РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА лентивирусные векторы, shРНК, РНК-интерференция.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ siРНК – малые интерферирующие РНК; miРНК – микроРНК; RISC – RNA-induced silencing complex; shРНК – малые шпилечные РНК; дцРНК – двухцепочечная РНК; HIV-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; VSV-G – белок G вируса везикулярного стоматита; CMV – цитомегаловирус; H1, U6 – промоторы ДНК-полимеразы III.

ВВЕДЕНИЕ

Метод РНК-интерференции широко используется для подавления экспрессии генов. К преимуществам этого метода относятся простота, возможность быстрого и существенного снижения экспрессии любого интересующего гена, высокая специфичность действия. Благодаря этим свойствам РНК-интерференцию применяют для изучения роли определенных генов в различных клеточных процессах. С этой целью созданы целые библиотеки siРНК, направленных против большого числа генов. В последнее время активно разрабатываются подходы к применению РНК-интерференции при наследственных заболеваниях, различных нейродегенеративных заболеваниях, злокачественных опухолях, а также в качестве противовирусной терапии. Еще одна область применения РНК-интерференции – поиск новых мишеней, воздействие на которые эффективно при различных заболеваниях.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

РНК-интерференция – механизм специфического к последовательности подавления экспрессии генов, который индуцируется присутствием в клетке экзогенной либо эндогенной двухцепочечной РНК (дцРНК) [1]. Этот эволюционно консервативный механизм работает практически во всех эукариотических организмах. Источником экзогенной дцРНК служат вирусы или искусственно введенная дцРНК. Эндогенная дцРНК образуется в результате транскрипции собственных генов клетки и часто выполняет регуляторные функции. Общим этапом РНК-интерференции является разрезание длинной дцРНК белком Dicer, который относится к семейству РНКаз типа III (рис. 1), в результате чего образуются малые дуплексы siРНК длиной 21–25 нуклеотидов. Дуплекс содержит пару неспаренных нуклеотидов и пару гидроксильных групп на 3'-концах и монофосфаты на 5'-концах (рис. 1). Подобная структура РНК-

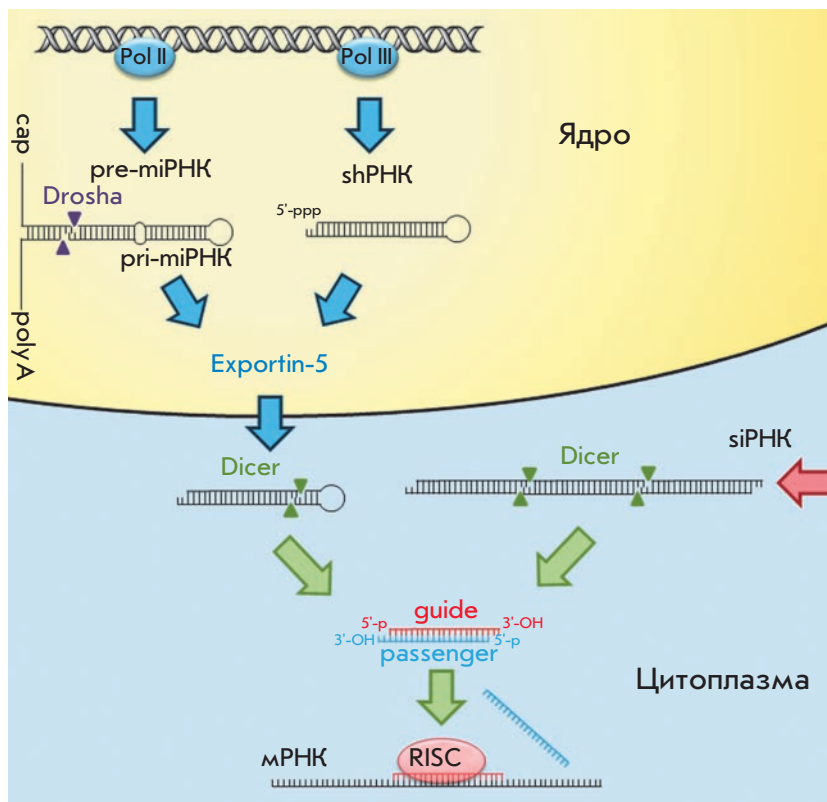


Рис. 1. Процессинг малых интерферирующих РНК в клетке. pri-miРНК транскрибируются РНК-полимеразой II, полученные транскрипты подвергаются кепированию и полиаденилированию. После этого под действием РНКазы типа III Drosha вырезается pre-miРНК. shРНК транскрибируется РНК-полимеразой III с образованием shРНК с трифосфатом на 5'-конце. Обе шпилечные структуры, pre-miРНК и shРНК, транспортируются из ядра в цитоплазму белком Exportin-5. В цитоплазме белок Dicer вырезает из шпилечных структур и экзогенных двухцепочечных РНК последовательности будущих miРНК и siРНК. В результате процессинга белком Dicer образуются дуплексы РНК длиной 21–25 п.н., имеющие пару неспаренных нуклеотидов на 3'-концах, а также ОН-группы на 3'-концах и монофосфаты на 5'-концах. Направляющая цепь (guide strand) загружается в белковый комплекс RISC, который связывается с мРНК, комплементарной последовательности направляющей цепи, пассажирская цепь (passenger strand) при этом удаляется из комплекса

дуплексов обеспечивает их нормальный процессинг белком семейства Ago, который играет ключевую роль в формировании комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [2]. Фрагменты РНК, которые образуются после разрезания дцРНК белком Dicer, включаются в состав комплекса RLC (RISC-loading complex), содержащего белки Dicer и TRBP. На следующем этапе происходит формирование комплекса предшествующего RISC (pre-RISC). В состав этого комплекса входит белок Ago-2, который разрезает РНК-дуплекс, оставляя в комплексе лишь направляющую цепь (guide strand) [3]. Эта цепь определяет специфичность подавления экспрессии, другая цепь, называемая пассажирской (passenger strand), удаляется из комплекса [4]. Выбор направляющей цепи происходит независимо от будущей мишени, ею становится цепь, 5'-конец которой обладает меньшей термодинамической стабильностью [5]. На следующем этапе направляющая цепь, входящая в RISC, связывается с участком мРНК-мишени по принципу комплементарности (рис. 1).

Процесс разрушения мРНК происходит в два этапа. Сначала в мРНК возникает первичный разрыв, обусловленный эндонуклеазной активностью PIWI-домена белка Ago. После этого под действием клеточных экзонуклеаз происходит разрушение (деградация) мРНК-мишени [6]. При неполной ком-

плементарности siРНК и мРНК первичный разрыв не образуется и соответственно мРНК не подвергается деградации. Важно отметить, что даже при неполной комплементарности направляющей цепи и мРНК подавление экспрессии гена может осуществляться на стадии трансляции подобно тому, как это делает miРНК [7]. Другой механизм действия siРНК связан с образованием комплекса RITS (RNA-induced transcriptional silencing), включающего белок Ago-1. мРНК-мишень распознается комплексом RITS в ходе транскрипции в результате взаимодействия с РНК-полимеразой II [8]. На следующем этапе в состав RITS могут вовлекаться гистон-метилтрансферазы, которые метилируют гистоны, что приводит к уплотнению хроматина и подавлению экспрессии на эпигенетическом уровне.

МикроРНК отличаются от siРНК как механизмом действия, так и некоторыми особенностями процессинга. Транскрипция miРНК осуществляется при помощи РНК-полимеразы II. Полученные РНК подвергаются кепированию и полиаденилированию [9]. Одни miРНК могут кодироваться отдельными генами, другие – целыми кластерами генов. miРНК могут транскрибироваться вместе с мРНК, при этом последовательность, кодирующая miРНК, находится в интроне белоккодирующего гена [7]. В результате транскрипции образуется pri-miРНК – предшественник miРНК.

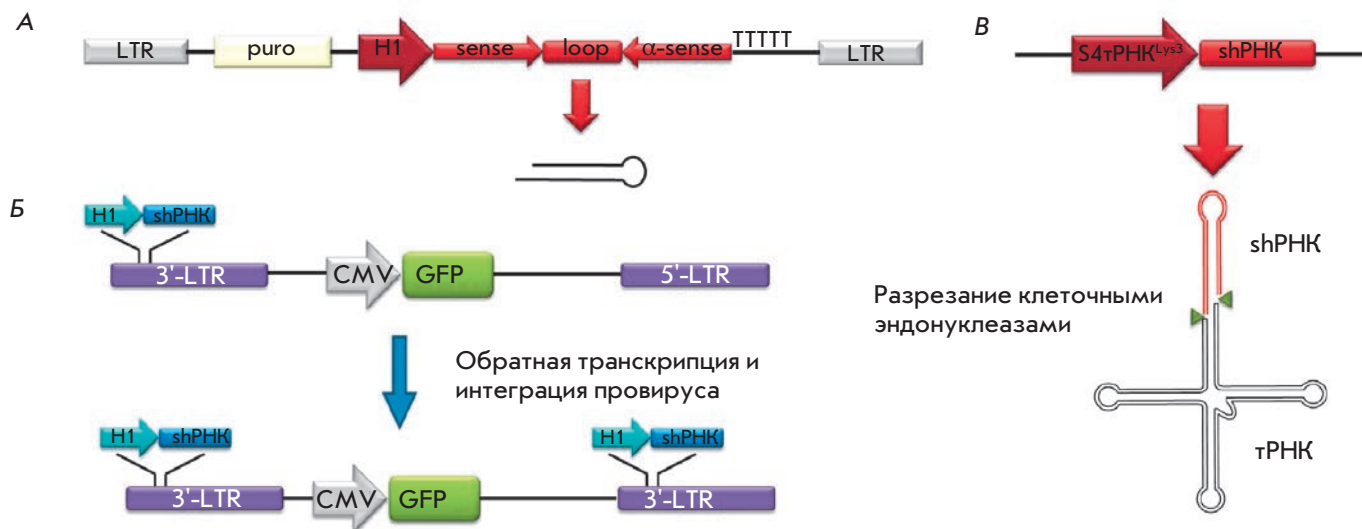


Рис. 2. Схемы векторов, направляющих синтез shPHK. А – Экспрессионная кассета вставлена между двумя LTR-последовательностями лентивирусного вектора. Экспрессия shPHK направляется промотором H1. Транскрипция начинается с последовательности будущей siPHK (sense), затем следуют «петли» (loop), перевернутая последовательность, комплементарная siPHK (α-sense), и терминирующая последовательность (тимины). В векторе также присутствует ген устойчивости к пурамицину (puro), что позволяет проводить селекцию [47]. Б – Экспрессионная кассета клонирована в последовательность 3'-LTR. Во время обратной транскрипции кассета удваивается, после интеграции провируса образуются две копии экспрессионной кассеты. В таком векторе можно клонировать еще и маркерный ген, например, ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), под промотором CMV [45]. В – Экспрессионная кассета, кодирующая shPHK, слитую с tPHK (S4tPHK^{Lys3}-shPHK). После транскрипции химерная РНК подвергается процессингу, подобно обычной tPHK, в результате чего высвобождается shPHK [52]

Его структура включает последовательность будущей miPHK, терминирующую петлю и фланкирующие последовательности [10]. Процессинг pri-miPHK происходит в ядре с помощью комплекса, состоящего из двух РНКаз III – Drosha и DGCR8 (у млекопитающих). В результате процессинга образуются предшественники miPHK длиной примерно 65 п.н., имеющие форму «шпильки» (рис. 1) [11]. Транспорт pre-miPHK в цитоплазму осуществляется белком Exportin-5 (рис. 1). В цитоплазме pre-miPHK разрезаются белком Dicer, в результате чего образуется дуплекс длиной примерно 22 п.н. [12]. Дуплекс miPHK, в отличие от дуплекса siPHK, обычно содержит неспаренные нуклеотиды в центре. Затем miPHK включается в комплекс RISC аналогично siPHK [13].

В отличие от siPHK, miPHK обычно полностью комплементарна только небольшому участку мРНК длиной несколько нуклеотидов. Полностью комплементарный мРНК участок miPHK чаще всего включает нуклеотиды 2–8 с 5'-конца и называется «seed»-последовательностью. «Seed»-последовательность определяет специфичные мишени miPHK [14]. miPHK обычно связывается с участком мРНК, который находится в 3'-нетранслируемой области и представлен несколькими копиями в одной и той же мРНК.

Поскольку размер участка, который должен быть полностью комплементарным, невелик, то сразу несколько разных мРНК могут служить мишенью одной miPHK. Предполагается, что полная комплементарность miPHK и мРНК-мишени может приводить к деградации мРНК, а в случае неполного комплементарного связывания miPHK и мРНК – к нарушению трансляции [7, 15].

Введение в клетки млекопитающих длинных дцРНК приводит к интерфероновому ответу, поэтому используют короткие, химически синтезированные siPHK, которые наиболее приближены по структуре к природным siPHK [16]. Однако действие синтетических siPHK носит кратковременный характер (несколько дней), что связано с их разрушением под действием клеточных нуклеаз. Помимо этого концентрация таких siPHK снижается при делении клеток. Эти недостатки можно обойти, используя векторы, которые направляют синтез малых шпильчатых РНК (shPHK) – предшественников siPHK. shPHK содержат последовательность направляющей цепи siPHK (длиной 21–29 п.н.), следующую за ней петлю примерно из 9 нуклеотидов, и последовательность, комплементарную направляющей цепи siPHK (рис. 2А). Использование такой структуры позволя-

ет обеспечить подавление экспрессии гена в течение длительного времени [17].

Для доставки shРНК в клетки оптимально использовать лентивирусные векторы. Важная особенность жизненного цикла лентивирусов – способность встраивать свой геном (в составе провирусной ДНК) в клеточную ДНК. Кроме того, лентивирусы, в отличие от простых ретровирусов, способны заражать неделяющиеся клетки. Несмотря на применение в качестве основы для вектора таких лентивирусов, как вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита кошек и вирус иммунодефицита крупного рогатого скота, наиболее часто используемым остается вирус иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), что обусловлено наилучшей изученностью его жизненного цикла [18, 19].

ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

Для переноса и экспрессии генов используют нерепликационно-компетентные системы на основе лентивирусов [20]. Такие системы позволяют встраивать в геном клетки-мишени ДНК (трансген), кодирующий целевой ген. Обычный лентивирусный вектор содержит *цис*-элементы вирусного генома, необходимые для сборки и интеграции вирусной частицы, а также последовательность, кодирующую целевой ген. Все *транс*-элементы вирусного генома из вектора удаляют. Основной способ получения лентивирусных векторов – котрансфекция вектора и плазмид, кодирующих вирусные белки [19]. Для снижения риска возникновения репликационно-компетентных частиц в результате рекомбинации компоненты генома вируса, необходимые для сборки лентивирусного вектора, обычно разделяют на три-четыре плазмиды: одну-две упаковочных, собственно векторную и плазмиду, кодирующую белок оболочки вируса. В настоящее время в упаковочных системах третьего поколения используют конструкции, из которых удалены все *цис*-элементы, кроме RRE и донорного сайта сплайсинга, необходимого для посттранскрипционного процессинга мРНК. Вместо длинного концевой повтора (LTR, long terminal repeat) используют также гетерологичный промотор (обычно CMV) и сигнал полиаденилирования вируса SV40. Гены *rev* и *gag/pol* вводят в клетки в составе разных экспрессирующих кассет. Используют также гуманизацию генов *gag/pol*, что позволяет экспрессировать их независимо от *rev*. Это дает возможность удалить также RRE из упаковывающей системы [21]. Важно, что столь значительные модификации в упаковочной системе не влияют на эффективность трансдукции лентивирусным вектором и существенно снижают риск образования репликационно-компетентных частиц в результате гомологичной рекомбинации.

Для снижения риска негомологичной рекомбинации разработана *транс*-лентивирусная упаковывающая система, в которой кодирующий участок *gag/pol* разделен на две части и встроены в состав двух разных экспрессирующих плазмид [22].

Псевдотипирование лентивирусных векторов

С целью увеличения тропизма лентивирусных частиц белок оболочки HIV-1 часто заменяют на белок G вируса везикулярного стоматита (VSV). Такие псевдотипированные лентивирусные частицы позволяют осуществлять трансдукцию практически всех видов клеток. Подобная модификация не только расширяет тропизм вирусных частиц, но и делает их более устойчивыми. Еще одно важное свойство VSV-G – его способность облегчать проникновение вектора в клетку путем эндоцитоза, тем самым уменьшая потребность во вспомогательных белках оболочки [23]. К основным недостаткам лентивирусных частиц, псевдотипированных VSV-G, относится их быстрая элиминация из системы кровообращения компонентами иммунной системы [24].

Одна из основных проблем, возникающих при использовании малых интерферирующих РНК, – недостаточная специфичность их доставки в клетки-мишени. Помимо VSV-G для псевдотипирования могут применяться и гетерологичные гликопротеины лиссавирусов, вируса лимфоцитарного хориоменингита, альфавирусов и бакуловирусов [25]. Эффективность трансдукции клеток печени повышается при использовании белка оболочки вируса гепатита С или бакуловируса [26]. Псевдотипирование лентивирусных частиц белками оболочки вируса бешенства (Rabies virus) позволяет лентивирусам заражать клетки центральной нервной системы *in vivo* [27]. Белки оболочки других вирусов часто используют для обеспечения более эффективной тканеспецифичной трансдукции.

Широкое распространение все больше получают методы, позволяющие экспонировать на поверхности вирусных частиц различные клеточные рецепторы или антитела к ним [28–30]. Общий принцип подобного подхода заключается в создании слитого белка, который, с одной стороны, можно успешно встраивать в состав оболочки векторных частиц и обеспечивать относительную стабильность таких частиц. С другой стороны, этот белок несет участок лиганда, необходимый для связывания с рецептором. Чаще всего основой для такого химерного белка служит гликопротеин амфотропного вируса лейкоза мышей A-MLV, гемагглютинины вирусов гриппа и кори. Эти вирусные белки оболочки модифицируют таким образом, чтобы они не могли распознавать свои естественные рецепторы, что позволяет избежать

неспецифичного заражения. По такому принципу были созданы лентивирусные векторы, содержащие на своей поверхности эпидермальный фактор роста (EGF) или одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (scFv) к CD20, слитые с гемагглютинином вируса кори и предназначенные для специфичного заражения В-клеток [31]. Другой подход состоит в создании лентивирусных частиц, на поверхности которых экспонирован гликопротеин А-MLV, слитый с scFv к CD3 либо с интерлейкином-7 (IL-7) [32, 33]. Подобная система позволяет осуществлять заражение Т-клеток. Можно также использовать для псевдотипирования сразу два лиганда: фактор стволовых клеток (SCF), слитый с гликопротеином А-MLV, и тромбопоэтин (ТРО), конъюгированный с гемагглютинином вируса гриппа. Трансдукция клеток популяции CD34⁺ лентивирусными частицами, несущими на своей поверхности либо тромбопоэтин, либо SCF, или оба лиганда, оказалась значительно более эффективной, чем при использовании VSV-G в качестве белка оболочки [34].

Лиганды клеточных рецепторов экспонируют на поверхности вирусных частиц не только при помощи поверхностных белков оболочки вирусов. В этом случае используемый белок должен содержать трансмембранный домен, а на поверхности вирусного вектора должен присутствовать белок оболочки, который может осуществлять слияние вируса с клеткой. С этой целью используют модифицированные белки оболочки вируса Синдбис или VSV-G, которые теряют способность связываться со своим «родным» рецептором. Вирус Синдбис имеет два поверхностных белка оболочки, E1 и E2. Белок E1 отвечает за слияние с клеткой, а E2 – за связывание с рецептором, при этом белок E1 функционирует независимо от E2. По такому принципу создан лентивирусный вектор с трансмембранной формой SCF и модифицированным белком оболочки вируса Синдбис [35]. При отсутствии у белка трансмембранного домена, необходимо для локализации на поверхности лентивирусных частиц, к нему присоединяют трансмембранный домен VSV-G или лейкоцитарного антигена HLA [36]. Для псевдотипирования лентивирусных частиц антителами необходимо, чтобы в упаковывающей системе присутствовали не только гены, кодирующие легкие и тяжелые цепи антител, но и гены белков Igα и Igβ, необходимых для экспонирования антител. По такой схеме получают лентивирусные частицы, на поверхности которых экспонированы антитела к поверхностным белкам CD20, DS-SIGN и CD3 [37–39].

Белки оболочки вируса Синдбис также используются для псевдотипирования лентивирусных частиц антителами. Для этого белок E2 модифицируют, встраивая в него Fc-связывающий домен белка

А (ZZ-домен), который связывает иммуноглобулины IgG. Трансдукция такими лентивирусными частицами возможна только в присутствии моноклональных антител. Выбор антител определяет тропизм лентивируса, что позволяет создавать вирусные частицы, специфичные к клеткам различной природы, не внося при этом изменений в упаковывающую систему [40]. К недостаткам белков оболочки вируса Синдбис относится зависимость активности белка E1 от pH (значение pH должно быть в диапазоне 4.5–5.0).

Снижение стабильности таких химерных белков при псевдотипировании лентивирусных частиц также можно считать их недостатком. Необходимо отметить и снижение эффективности заражения клеток-мишеней при использовании таких лентивирусных частиц, что, однако, может компенсироваться высокой специфичностью.

Другой подход, позволяющий обеспечить специфичное заражение клеток, состоит в использовании в составе оболочки вируса белков, связывание которых со специфичным поверхностным рецептором приводит к значительному снижению эффективности трансдукции клеток, внесение трансгена в которые нежелательно [29]. Такой препятствующий заражению белок можно связать с вирусным гликопротеином при помощи аминокислотной последовательности, чувствительной к определенным протеазам. В этом случае заражение происходит в два этапа: сначала лиганд на поверхности вируса связывается с клеточным рецептором, а затем под действием определенных протеаз происходит расщепление пептидной вставки. После расщепления вставки гликопротеин может связываться со своим специфичным рецептором на поверхности клеток. Подобный подход позволяет осуществлять заражение клеток в присутствии определенных протеаз.

Использование тканеспецифичных промоторов

Неспецифичная трансдукция клеток, а следовательно, экспрессия трансгена в этих клетках может приводить к различным негативным эффектам. В частности, экспрессия трансгена в антигенпредставляющих клетках (АПК) может вызывать развитие иммунного ответа и активацию Т-клеток [41]. Для снижения эффекта от неспецифичного заражения используют тканеспецифичные промоторы. Псевдотипирование и использование тканеспецифичных промоторов позволяют добиться экспрессии трансгена только в требуемых клетках. Однако тканеспецифичные промоторы могут быть довольно слабыми, и уровень экспрессии целевого гена может быть недостаточным. С целью усиления таких промоторов могут использоваться энхансеры более сильных промоторов. Энхансер промотора CMV, используемый вместе

с различными тканеспецифичными промоторами, обеспечивает многократное увеличение экспрессии целевого гена, не снижая при этом специфичности промоторов [42]. Место встраивания трансгена в геном клетки-мишени определяется случайным образом, но встраивание происходит предпочтительно в транскрипционно активные области. Важно учитывать, что встроенный трансген может случайно оказаться под контролем сильного промотора. В таком случае его экспрессия не будет зависеть от тканеспецифичности промотора, поэтому используют инсультаторы, которые блокируют эффекты соседних энхансеров [28].

Экспрессия трансгена может регулироваться на посттранскрипционном уровне. В основе механизма такой регуляции лежит РНК-интерференция. На данный момент известно более 200 miРНК, которые обладают тканеспецифичной экспрессией. Показано, что внесение в ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) четырех сайтов, узнаваемых miРНК miR-142, экспрессирующейся в основном в гемопоэтических клетках, приводит к снижению уровня флуоресценции только в этих клетках [28, 43]. Учитывая, что постоянно открывают новые паттерны экспрессии miРНК в различных клетках, можно предположить, что этот метод представляет большой интерес для осуществления тонкого контроля экспрессии вносимых генов.

Малые шпилечные РНК

shРНК являются предшественниками siРНК. Обычно их экспрессируют с использованием промоторов РНК-полимеразы III, таких, как U6 или H1 (мышь или человека) [43]. Эти промоторы имеют небольшой размер (около 400 п.н.), при этом транскрипция начинается с позиции +1, а в случае промотора U6 желательнее, чтобы транскрипция начиналась с гуанина [44]. Сигналом терминации транскрипции служит последовательность из 5–6 остатков тимина, что приводит к получению двухцепочечной shРНК с неспаренным 3'-концом, необходимым для дальнейшего процессинга белком Dicer. Промоторы U6 и H1 обеспечивают стабильный и достаточно высокий уровень экспрессии shРНК в клетках всех типов. shРНК, полученные в результате транскрипции с помощью РНК-полимеразы III, не имеют 5'-кепа и 3'-поли(А)-последовательности, они не подвергаются процессингу белком Drosha. Их транспорт в цитоплазму осуществляется при участии белка Exportin-5 [12]. Использование промоторов РНК-полимеразы III при создании лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, позволяет добиться высокого уровня экспрессии shРНК практически в любых клетках. Существуют подходы, при которых кассеты,

экспрессирующие shРНК, клонируют в область 3'-LTR лентивирусного вектора [45]. При синтезе провируса в качестве матрицы для 5'-LTR используется 3'-LTR. В результате в провирусной вставке оказываются две копии экспрессионной кассеты (рис. 2Б).

В лентивирусный вектор часто включают маркерные гены, в качестве которых обычно используют гены, кодирующие флуоресцентные белки или сообщающие клеткам устойчивость к определенному антибиотику. Присутствие в векторе маркерных генов позволяет проводить селекцию трансдуцированных клеток и оценивать эффективность трансдукции. С помощью лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, получены клеточные линии со стабильно подавленной экспрессией активированных онкогенов, выявляемых при острых миелоидных лейкозах. В качестве маркерного гена в вектор был внесен ген устойчивости к пуромицину (рис. 2А) [46, 47].

При конструировании векторов, направляющих синтез shРНК, важно учитывать, что повышенный уровень экспрессии shРНК в клетках может иметь неблагоприятные последствия. Показано, что трансдукция гепатоцитов мыши вектором на основе аденоассоциированного вируса, в котором транскрипция shРНК контролируется промотором U6, в половине случаев приводит к повреждению печени [48]. В этой работе [48] использовали 49 различных векторов, каждый из которых кодировал уникальную shРНК. Токсический эффект этих векторов связывают с конкуренцией между shРНК и клеточными miРНК за взаимодействие с белками Dicer и Exportin-5, участвующими в процессинге обоих видов малых РНК. Существенно, что получаемая shРНК содержит на 5'-конце трифосфат, который может вызывать интерфероновый ответ и прекращать трансляцию белков в клетке. Наличие двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце стебля shРНК существенно для эффективной работы процессорирующих белков Exportin-5 и Dicer. Увеличение числа неспаренных нуклеотидов заметно снижает функциональную активность таких shРНК [49–51]. Избежать образования трифосфата на 5'-конце можно при помощи подхода, в котором происходит совместная транскрипция shРНК и tРНК [52]. При этом синтезируется химерная РНК, процессорируемая клеточными эндонуклеазами, в результате чего образуется shРНК, содержащая монофосфат на 5'-конце (рис. 2В). Использование промоторов tРНК позволяет предотвратить возникновение неспецифических ответов, при этом уровень экспрессии shРНК оказывается значительно ниже, чем при использовании промоторов РНК-полимеразы III.

Если же первые 2–8 нуклеотидов направляющей цепи siРНК комплементарны «seed»-

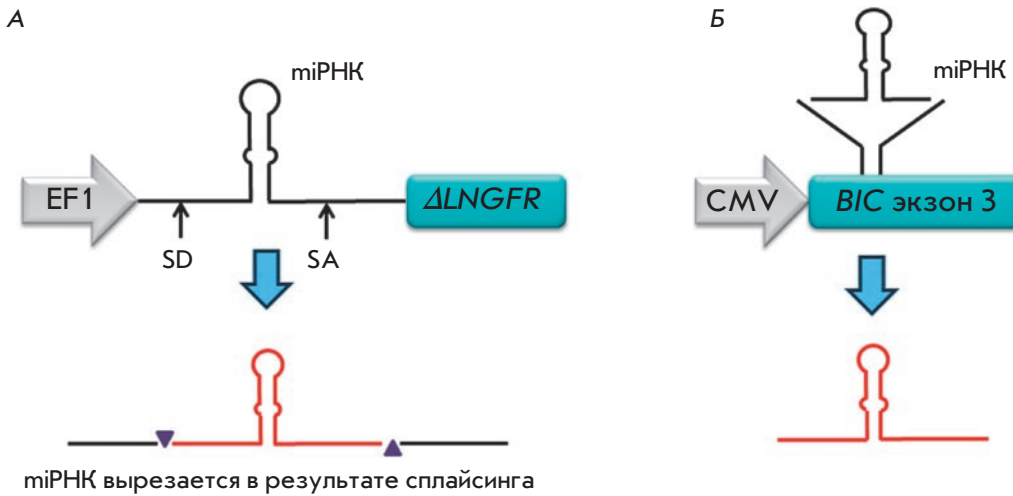


Рис. 3. Схемы векторов, направляющих синтез модифицированных miRNA. А – miRNA клонирована под промотор EF1α, так что она экспрессируется вместе с участком гена NGFR(ΔLNGFR) в первом интроне и вырезается в результате сплайсинга. SD – донорный сайт сплайсинга; SA – акцепторный сайт сплайсинга [62]. Б – miRNA экспрессируется в составе экзона 3 гена BIC, в котором она присутствовала изначально [63]

последовательности какой-либо miRNA, то такая siRNA может работать, как miRNA. Это может приводить к неспецифичному действию siRNA. Способность siRNA действовать как miRNA может использоваться для подавления экспрессии некоторых генов, например, гена CCR5 [53]. siRNA, специфичная в отношении гена CCR5, комплементарна «seed»-последовательности в 3'-UTR мРНК. Такая siRNA вызывала деградацию мРНК и нарушение трансляции, как это происходит при действии miRNA. При выборе последовательности shRNA следует учитывать, что 5'-конец направляющей цепи дуплекса, образуемого в результате процессинга, должен обладать меньшей термодинамической стабильностью. Несоблюдение этих правил может привести к тому, что в RISC попадет пассажирская цепь вместо направляющей, в результате чего снизится специфичность действия shRNA. Предполагается, что промотор H1 лучше подходит для использования *in vivo*, чем промотор U6, поскольку промотор H1, несмотря на его меньшую эффективность, менее токсичен [54]. Успешное применение лентивирусных векторов, направляющих синтез shRNA, показано на животных моделях различных заболеваний [55–57]. В частности, экспрессия shRNA сохранялась на протяжении 9 мес. после инъекции лентивирусных частиц, и поддерживалось подавление экспрессии репортерного гена в клетках головного мозга мыши [58].

Избежать возникновения нежелательных эффектов, связанных с применением shRNA (интерфероновый ответ, конкуренция с клеточными miRNA, неспецифичность действия), позволяют различные подходы. Ряд из них основан на адаптации процессинга искусственных shRNA к механизмам, используемым клеточными miRNA [59]. Для этого можно заменить последовательность направляющей

цепи будущей miRNA на искусственную, сохранив при этом структуру предшественников miRNA. miRNA транскрибируются полимеразой II, поэтому при конструировании вектора предпочтительно использовать промоторы этого фермента. Показано, что в векторе на основе аденоассоциированного вируса экспрессия shRNA, находящейся под контролем промотора U6, в 10 раз выше, чем экспрессия miR-30 под тем же промотором. Однако уровень подавления репортерного гена оказался примерно одинаковым при значительно более низком токсическом эффекте конструкции, содержащей miR-30 [60, 61]. Недостатком систем на основе miR-30 является то, что в качестве направляющей цепи в данном случае Dicer может выбирать обе цепи дуплекса miRNA.

Трансдукция клеток лентивирусным вектором, несущим ген рецептора фактора роста нервов (NGFR), в первый интрон которого под контроль промотора EF1α встроена последовательность, кодирующая pri-miR-223 (около 200 п.н.), приводит к стабильной экспрессии и гена NGFR, и miRNA (рис. 3А). Последовательность направляющей цепи в «стебле» miRNA можно заменить последовательностями направляющих цепей других miRNA или siRNA [62]. Существует также подход, который позволяет обеспечить стабильную экспрессию гена BIC мыши и кодируемой им miR-155 с измененной последовательностью направляющей цепи (рис. 3Б) [63]. Вектор, содержащий участок гена BIC, в том числе и последовательность miR-155, обеспечивал успешную экспрессию как исходной микроRNA, так и микроRNA с измененной последовательностью направляющей цепи (рис. 3Б) [63]. В настоящий момент не существует общих правил конструирования искусственных miRNA, что связано, в первую очередь, с недостаточной изученностью их процессинга.

Одновременный синтез нескольких малых интерферирующих РНК

В некоторых случаях предпочтительна одновременная экспрессия сразу нескольких siРНК, например, при проведении противовирусной терапии. Это связано с тем, что некоторые вирусы мутируют с высокой скоростью и велика вероятность возникновения устойчивости к действию конкретной siРНК. Использование мультиплексных конструкций, позволяющих синтезировать сразу несколько siРНК, значительно снижает вероятность возникновения устойчивых форм вируса.

Поэтому был создан лентивирусный вектор, направляющий синтез длинных шпилечных РНК (lhРНК) со структурой «петля-стебель». Процессинг таких lhРНК происходит при участии белка Dicer, под действием которого образуются несколько siРНК. Нуклеотидная последовательность lhРНК, предшественника siРНК, подбирается по тому же принципу, как и в случае shРНК. С помощью lhРНК размером 50–80 п.н. – предшественника двух-трех siРНК против разных участков общего региона генов *tat/rev*, было достигнуто подавление репликации HIV-1 (рис. 4А) [64]. Сходный метод использовали при подавлении репликации вирусов гепатита В и С [65, 66]. Эффективность процессинга lhРНК белком Dicer снижается по мере приближения последовательности siРНК к «петле», что приводит к образованию различного количества siРНК и неравномерному подавлению экспрессии генов-мишеней.

Поскольку промоторы РНК-полимеразы III имеют достаточно небольшой размер (200–400 п.н.), то в один вектор можно встраивать сразу несколько последовательностей siРНК, каждая из которых контролируется собственным промотором. При этом берут разные промоторы РНК-полимеразы III (U6, H1 и 7SK), так как использование одинаковых промоторов может привести к рекомбинации между их последовательностями и делеции одной или нескольких экспрессионных кассет в четырех случаях из пяти [67]. Был сконструирован вектор, обеспечивающий синтез четырех shРНК под контролем промоторов U6, H1 мыши и U6, 7SK человека. При этом промоторы H1 мыши и U6 человека были слиты в один двунаправленный промотор (рис. 4Б). С помощью этого вектора достигнуто подавление экспрессии четырех различных генов [68].

Для одновременной экспрессии нескольких siРНК можно использовать кластеры, кодирующие полицистронные miРНК, из которых образуются несколько pre-miРНК. В результате транскрипции кластера генов *miR-17-92* образуются двухцепочечные pri-miРНК размером около 1 т.п.н. – предшественники шести различных pre-miРНК. Кластер генов

mir-17-92 использовали при создании лентивирусных векторов, направляющих синтез четырех HIV-1-специфичных miРНК. Из кластера генов взяли последовательности, которые кодируют pre-miРНК и содержат по 40 нуклеотидов с каждой стороны структуры «петля-стебель», и встроили их в вектор. Последовательности направляющих цепей будущих miРНК заменили участками, специфичными в отношении HIV-1 (рис. 4В) [69]. При замене последовательностей направляющих цепей учитывали такие особенности структуры первоначальных miРНК, как мисматчи и термодинамическая стабильность.

Применение малых интерферирующих РНК

В настоящее время разрабатываются подходы к клиническому применению малых интерферирующих РНК. Проводятся клинические испытания нескольких десятков препаратов на основе siРНК, направленных против заболеваний различной природы. При этом испытан только один препарат, в котором используется лентивирусная доставка shРНК. Применение лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, сдерживается их относительной небезопасностью, обусловленной возможными неспецифическими ответами, которые может вызывать экспрессия shРНК в клетках, а также вероятностью инсерционного мутагенеза. Однако использование лентивирусных векторов для доставки siРНК имеет ряд существенных преимуществ. С их помощью можно добиться стабильного и продолжительного синтеза shРНК в делящихся и неделящихся клетках, что делает перспективным их применение при хронических заболеваниях.

Механизм РНК-интерференции является частью системы противовирусной защиты организма, поэтому значительный интерес представляет использование РНК-интерференции при хронических вирусных инфекциях [59, 70, 71], к которым относятся заболевания, вызываемые вирусами гепатита В и С, а также HIV-1. Однако при применении РНК-интерференции существует вероятность возникновения резистентных форм вируса, что ограничивает применение этого метода [72]. Конструирование лентивирусных векторов, которые могут кодировать сразу три-четыре shРНК, специфичных в отношении различных вирусных генов, позволит значительно снизить вероятность появления устойчивых форм вируса. Существующие методы доставки siРНК в Т-клетки и макрофаги – мишени HIV-1, малоэффективны. Использование лентивирусных векторов может быть эффективным способом введения siРНК в клетки-мишени HIV-1. Однако в случае лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, специфичных в отношении вирусных генов, возможно снижение

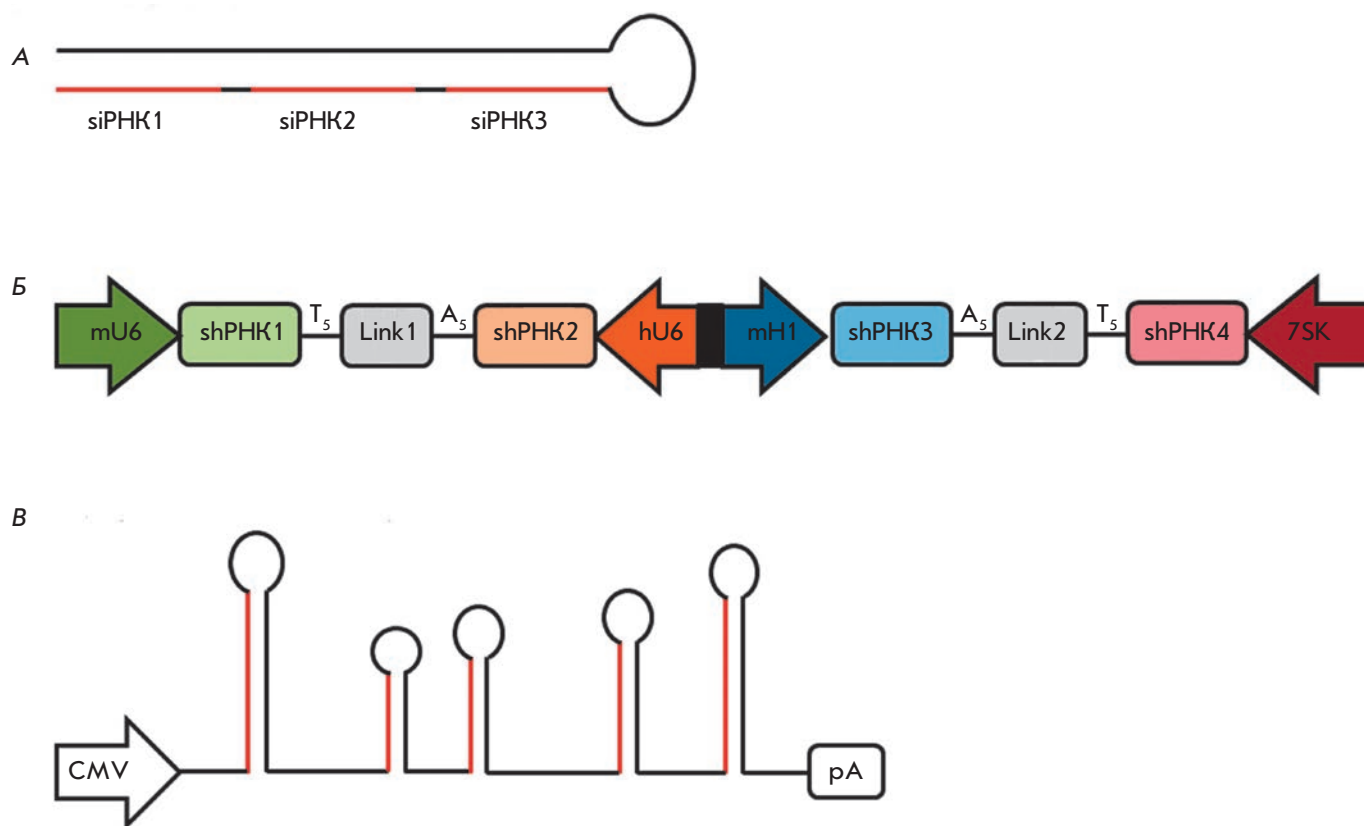


Рис. 4. Различные подходы к мультиплексной экспрессии малых интерферирующих РНК. А – Длинные шпилечные РНК (lhРНК) содержат последовательности нескольких siРНК (выделены красным), которые затем вырезаются белком Dicer [64]. Б – Экспрессия четырех shРНК с одного вектора под действием разных промоторов РНК-полимеразы III [68]. В – Экспрессия нескольких miРНК с использованием полицистрона *mir-17-92*. miРНК с измененными последовательностями направляющих цепей (выделены красным) были встроены в основу полицистрона *mir-17-92* [69]

как эффективности формирования лентивирусных частиц, так и их титра [73], поэтому в гены, используемые в упаковочной системе, вводят точечные мутации, которые не влияют на синтез белков, необходимых для сборки вирусных частиц. Подбор таких мутаций несколько усложняет процесс конструирования вектора, особенно если shРНК подбирают к консервативным участкам HIV-1. При заражении HIV-1 белок оболочки вируса связывается с рецептором CD4⁺, экспонированным на поверхности клеток-мишеней, а в качестве корецептора вирус использует клеточный рецептор CCR5. Известно, что гомозиготная делеция в гене *CCR5* человека делает клетки устойчивыми к заражению HIV-1, при этом мутация, по-видимому, практически не влияет на нормальное функционирование клеток [74]. Показано, что подавление экспрессии рецептора CCR5 с помощью shРНК также делает клетки устойчивыми к заражению вирусом как *in vitro*, так и *in vivo* [75–78]. К настоящему времени выявлено несколько белков,

функции которых не являются жизненно необходимыми для Т-клеток или макрофагов, но играют важную роль в жизненном цикле HIV-1 [79].

Оптимальным подходом считается получение устойчивых к HIV-1 Т-клеток и макрофагов из их общих предшественников. С этой целью проводили трандукцию ранних гемопоэтических клеток-предшественников лентивирусными векторами, которые направляют синтез shРНК, специфичных в отношении генов *CCR5* или *CXCR-4*. Потомки таких клеток – Т-клетки и макрофаги – приобретали устойчивость к вирусу [80–82]. Существует подход, позволяющий экспрессировать shРНК вместе с другими генами. В качестве примера можно привести лентивирусный вектор, с помощью которого помимо экспрессии shРНК, специфичной в отношении общего участка генов *tat/rev*, удалось обеспечить синтез ложной мишени для вирусного белка ТАТ. Эта ложная мишень блокирует действие белка ТАТ, а также синтез рибозима, специфичного в отношении рецеп-

тора CCR5 [83, 84]. Эффективность такого вектора была проверена на гуманизированных мышах, с его помощью достигнуто стабильное ингибирование HIV-1 на разных стадиях жизненного цикла [85]. Клинические испытания показали безопасность использования этого вектора при аутологичной трансплантации костного мозга больным HIV-1 и лимфомой. У больных лимфомой на стадии ремиссии, достигнутой после стандартной схемы лечения, отсутствовали побочные эффекты, связанные с введением shРНК. Детектируемый уровень экспрессии shРНК сохранялся при этом на протяжении 24 мес.

Злокачественные опухоли развиваются в результате возникновения мутаций, которые приводят к избыточной экспрессии генов, стимулирующих пролиферацию клеток и нарушение апоптоза. РНК-интерференция является удобным инструментом модуляции экспрессии генов. Считается, что методы, основанные на принципе РНК-интерференции, могут представлять значительный интерес для терапии опухолей. Классические подходы к терапии злокачественных заболеваний обладают рядом существенных недостатков, связанных с неспецифичностью их действия. Использование РНК-интерференции позволяет при относительно небольших затратах обеспечить специфическое воздействие на онкогены. В настоящий момент проходят клинические испытания около 10 препаратов на основе siРНК. Основное препятствие к применению РНК-интерференции в терапии злокачественных заболеваний – несовершенство методов доставки siРНК в опухолевые клетки. Одна из удобных и эффективных систем переноса генов основана на использовании лентивирусных векторов. Эти системы позволяют с высокой специфичностью встраивать в геном клеток-мишеней последовательности, кодирующие shРНК. С этой целью активно разрабатывают методы псевдотипирования лентивирусных частиц и используют тканеспецифичные промоторы. Существенным потенциалом обладают и системы с мультиплексной экспрессией shРНК, благодаря которым появляется возможность специфически подавлять сразу несколько генов, участвующих в развитии опухоли. Использование нескольких shРНК, специфичных к разным участкам одного активированного онкогена, позволяет повысить эффективность таких систем [86].

Многие miРНК человека обладают способностью подавлять рост злокачественных опухолей [87, 88]. В связи с этим некоторые группы исследователей работают над использованием miРНК в терапии злокачественных новообразований, в клетках которых снижена экспрессия онкосупрессорных miРНК. Показано, что восстановление экспрессии онкосупрессорных miРНК приводит к снижению скорости роста клеток

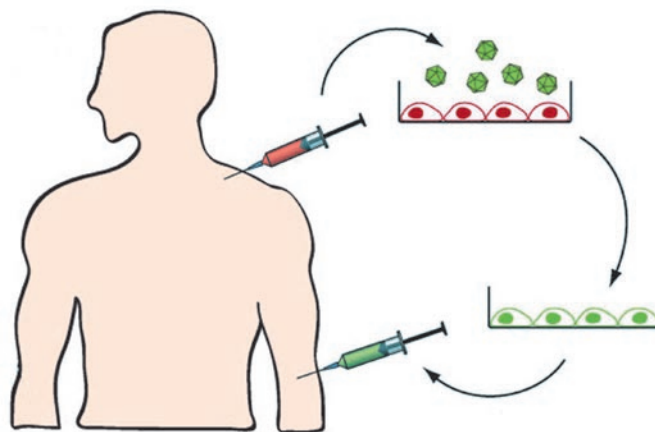


Рис. 5. Трансдукция клеток костного мозга *ex vivo*. Во время аутологичной трансплантации клетки костного мозга трансдуцируют лентивирусными векторами, направляющими синтез shРНК. Затем трансдуцированные клетки вводят больному после проведения лучевой терапии [84]

немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака печени и хронического лимфолейкоза [89–92]. Однако неэффективность трансдукции *in vivo* до сих пор остается основной проблемой при применении лентивирусных векторов в качестве основного вида терапии. Наиболее подходящей областью для применения лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК, считается терапия лейкозов (*рис. 5*). Перспективной может быть аутологичная трансплантация кроветворных клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, специфичным в отношении одного или нескольких активированных онкогенов. Безопасность такого подхода показана при использовании лентивирусных векторов, которые направляют синтез shРНК, ингибирующих HIV-1 [93].

Поиск новых генов-мишеней, вовлеченных в развитие опухолей, также рассматривается как перспективное направление применения shРНК. В настоящее время активно изучаются профили экспрессии генов в злокачественных клетках, благодаря чему уже удалось обнаружить целый ряд генов, повышенная экспрессия которых характерна для опухолей определенного типа. Созданы обширные библиотеки лентивирусных shРНК-векторов, которые позволяют осуществлять поиск генов, перспективных для разработки новых химиотерапевтических препаратов [94, 95]. Индуцированное shРНК подавление экспрессии онкогенов позволяет оценить их вклад в поддержание злокачественного статуса клеток опухоли, как это было сделано с помощью лентивирусных век-

торов, направляющих синтез shРНК, специфичных к онкогенам *c-kit* и *AML1-ETO*, в клетках, полученных от больного острым миелоидным лейкозом. Данную систему успешно использовали для изучения ингибирующего действия биназы на рецепторную тирозинкиназу КИТ [96].

Предполагается, что shРНК можно успешно применять в генной терапии таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона. Тем более перспективным представляется использование лентивирусных векторов, поскольку лентивирусы способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и заражать клетки цен-

тральной нервной системы. Лентивирусные векторы позволяют добиться стабильного синтеза shРНК, что может быть крайне важным в терапии хронических заболеваний. Псевдотипирование лентивирусных векторов при помощи белка оболочки вируса бешенства может повысить эффективность заражения клеток центральной нервной системы. ●

Работа поддержана Государственным контрактом № 16.512.11.2266, Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (грант № 11-04-01365-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meister G., Tuschl T. // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 343–349.
- Tomari Y., Zamore P.D. // *Genes Dev*. 2005. V. 19. № 5. P. 517–529.
- Kim K., Lee Y.S., Carthew R.W. // *RNA*. 2007. V. 13. № 1. P. 22–29.
- Macrae L.J., Ma E., Zhou M., Robinson C.V., Doudna J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 2. P. 512–517.
- Collins R.E., Cheng X. // *FEBS Lett*. 2005. V. 579. № 26. P. 5841–5849.
- Shen B., Goodman H.M. // *Science*. 2004. V. 306. № 5698. P. 997.
- Carthew R.W., Sontheimer E.J. // *Cell*. 2009. V. 136. № 4. P. 642–655.
- Lippman Z., Martienssen R. // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 364–370.
- Kim V.N. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005. V. 6. № 5. P. 376–385.
- Bartel D.P. // *Cell*. 2004. V. 116. № 2. P. 281–297.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Nam J.W., Heo I., Rhee J.K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.T., Kim V.N. // *Cell*. 2006. V. 125. № 5. P. 887–901.
- Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 24. P. 3011–3016.
- Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R. // *Cell*. 2005. V. 123. № 4. P. 631–640.
- Lai E.C. // *Nat. Genet*. 2002. V. 30. № 4. P. 363–364.
- Wu L., Fan J., Belasco J.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 11. P. 4034–4039.
- Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2003. V. 67. № 4. P. 657–685.
- Van den Haute C., Eggermont K., Nuttin B., Debysers Z., Baekelandt V. // *Hum. Gene Ther*. 2003. V. 14. № 18. P. 1799–1807.
- Cockrell A.S., Kafri T. // *Mol. Biotechnol*. 2007. V. 36. № 3. P. 184–204.
- Спирин П.В., Вильгельм А.Э., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология*. 2008. Т. 42. № 5. С. 913–926.
- Pluta K., Kasprzak M.M. // *Acta Biochim. Pol*. 2009. V. 56. № 4. P. 531–595.
- Kotsopoulou E., Kim V.N., Kingsman A.J., Kingsman S.M., Mitrophanous K.A. // *J. Virol*. 2000. V. 74. № 10. P. 4839–4852.
- Kappes J.C., Wu X., Wakefield J.K. // *Methods Mol. Med*. 2003. V. 76. P. 449–465.
- Aiken C. // *J. Virol*. 1997. V. 71. № 8. P. 5871–5877.
- Croyle M.A., Callahan S.M., Auricchio A., Schumer G., Linse K.D., Wilson J.M., Brunner L.J., Kobinger G.P. // *J. Virol*. 2004. V. 78. № 2. P. 912–921.
- Cronin J., Zhang X.Y., Reiser J. // *Curr. Gene Ther*. 2005. V. 5. № 4. P. 387–398.
- Bartosch B., Vitelli A., Granier C., Goujon C., Dubuisson J., Pascale S., Scarselli E., Cortese R., Nicosia A., Cosset F.L. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. № 43. P. 41624–41630.
- Mazarakis N.D., Azzouz M., Rohll J.B., Ellard F.M., Wilkes F.J., Olsen A.L., Carter E.E., Barber R.D., Baban D.F., Kingsman S.M., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2001. V. 10. № 19. P. 2109–2121.
- Frecha C., Szécsi J., Cosset F.L., Verhoeven E. // *Curr. Gene Ther*. 2008. V. 8. № 6. P. 449–460.
- Verhoeven E., Cosset F.L. // *J. Gene Med*. 2004. V. 6. Suppl 1. P. S83–S94.
- Mátrai J., Chuah M.K., Van den Driessche T. // *Mol. Ther*. 2010. V. 18. № 3. P. 477–490.
- Funke S., Maisner A., Mühlebach M.D., Koehl U., Grez M., Cattaneo R., Cichutek K., Buchholz C.J. // *Mol. Ther*. 2008. V. 16. № 8. P. 1427–1436.
- Maurice M., Verhoeven E., Salmon P., Trono D., Russell S.J., Cosset F.L. // *Blood*. 2002. V. 99. № 7. P. 2342–2350.
- Verhoeven E., Dardalhon V., Ducrey-Rundquist O., Trono D., Taylor N., Cosset F.L. // *Blood*. 2003. V. 101. № 6. P. 2167–2174.
- Verhoeven E., Nègre D., Cosset F.L. // *Methods Mol. Biol*. 2008. V. 434. P. 99–112.
- Froelich S., Ziegler L., Stroup K., Wang P. // *Biotechnol. Bioeng*. 2009. V. 104. № 1. P. 206–215.
- Lei Y., Joo K.I., Zarzar J., Wong C., Wang P. // *Virology*. 2010. V. 7. P. 35.
- Yang L., Bailey L., Baltimore D., Wang P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 31. P. 11479–11484.
- Yang H., Joo K.I., Ziegler L., Wang P. // *Pharm. Res*. 2009. V. 26. № 6. P. 1432–1445.
- Yang L., Yang H., Rideout K., Cho T., Joo K.I., Ziegler L., Elliot A., Walls A., Yu D., Baltimore D., et al. // *Nat. Biotechnol*. 2008. V. 26. № 3. P. 326–334.
- Morizono K., Bristol G., Xie Y.M., Kung S.K., Chen I.S. // *J. Virol*. 2001. V. 75. № 17. P. 8016–8020.
- Cui Y., Kelleher E., Straley E., Fuchs E., Gorski K., Levitsky H., Borrello I., Civin C.I., Schoenberger S.P., Cheng L., et al. // *Nat. Med*. 2003. V. 9. № 7. P. 952–958.
- Gruh I., Wunderlich S., Winkler M., Schwanke K., Heinke J., Blömer U., Ruhparwar A., Rohde B., Li R.K., Haverich A., et al. // *J. Gene Med*. 2008. V. 10. № 1. P. 21–32.
- Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2003. V. 4. № 6. P. 457–467.
- Boden D., Pusch O., Lee F., Tucker L., Shank P.R., Ramratnam B. // *Nucl. Acids Res*. 2003. V. 31. № 17. P. 5033–5038.

45. Tiscornia G., Singer O., Verma I.M. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 1. P. 234–240.
46. Спириин П.В., Баскаран Д., Рубцов П.М., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л., Прасолов В.С. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. № 2. С. 98–103.
47. Спириин П.В., Никитенко Н.А., Лебедев Т.Д., Рубцов П.М., Stocking C., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. № 6. С. 1036–1045.
48. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A. // *Nature.* 2006. V. 441. № 7092. P. 537–541.
49. Hornung V., Ellegast J., Kim S., Brzozka K., Jung A., Kato H., Poeck H., Akira S., Conzelmann K.K., Schlee M., et al. // *Science.* 2006. V. 314. № 5801. P. 994–997.
50. Pichlmair A., Schulz O., Tan C.P., Naslund T.I., Liljestrom P., Weber F., Reis e Sousa C. // *Science.* 2006. V. 314. № 5801. P. 997–1001.
51. Kenworthy R., Lambert D., Yang F., Wang N., Chen Z., Zhu H., Zhu F., Liu C., Li K., Tang H. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 19. P. 6587–6599.
52. Scherer L.J., Frank R., Rossi J.J. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 8. P. 2620–2628.
53. Ehsani A., Saetrom P., Zhang J., Alluin J., Li H., Snøve O. Jr., Aagaard L., Rossi J.J. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 4. P. 796–802.
54. An D.S., Qin F.X., Auyeung V.C., Mao S.H., Kung S.K., Baltimore D., Chen I.S. // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 4. P. 494–504.
55. Gupta S., Maitra R., Young D., Gupta A., Sen S. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. V. 297. № 2. P. 627–636.
56. Bot I., Guo J., van Eck M., van Santbrink P.J., Groot P.H., Hildebrand R.B., Seppen J., van Berkel T.J., Biessen E.A. // *Blood.* 2005. V. 106. № 4. P. 1147–1153.
57. Eren-Koçak E., Turner C.A., Watson S.J., Akil H. // *Biol. Psychiatry.* 2011. V. 69. № 6. P. 534–540.
58. Mäkinen P.I., Koponen J.K., Kärkkäinen A.M., Malm T.M., Pulkkinen K.H., Koistinaho J., Turunen M.P., Ylä-Herttua S. // *J. Gene Med.* 2006. V. 8. № 4. P. 433–441.
59. Manjunath N., Wu H., Subramanya S., Shankar P. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. № 9. P. 732–745.
60. McBride J.L., Boudreau R.L., Harper S.Q., Staber P.D., Monteyes A.M., Martins I., Gilmore B.L., Burstein H., Peluso R.W., Polisky B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5868–5873.
61. Zeng Y., Wagner E.J., Cullen B.R. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. № 6. P. 1327–1333.
62. Amendola M., Passerini L., Pucci F., Gentner B., Bacchetta R., Naldini L. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. № 6. P. 1039–1052.
63. Chung K.H., Hart C.C., Al-Bassam S., Avery A., Taylor J., Patel P.D., Vojtek A.B., Turner D.L. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 7. P. 53.
64. Sano M., Li H., Nakanishi M., Rossi J.J. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 1. P. 170–177.
65. Watanabe T., Sudoh M., Miyagishi M., Akashi H., Arai M., Inoue K., Taira K., Yoshida M., Kohara M. // *Gene Ther.* 2006. V. 13. № 11. P. 883–892.
66. Weinberg M.S., Ely A., Barichievy S., Crowther C., Mufamadi S., Carmona S., Arbuthnot P. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 3. P. 534–541.
67. Brake O., Hooft K.T., Liu Y.P., Centlivre M., von Eije K.J., Berkhout B. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 3. P. 557–564.
68. Gou D., Weng T., Wang Y., Wang Z., Zhang H., Gao L., Chen Z., Wang P., Liu L. // *J. Gene Med.* 2007. V. 9. № 9. P. 751–763.
69. Liu Y.P., Haasnoot J., ter Brake O., Berkhout B., Konstantinova P. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 9. P. 2811–2824.
70. Ashfaq U.A., Yousaf M.Z., Aslam M., Ejaz R., Jahan S., Ullah O. // *Virology.* 2011. V. 8. P. 276.
71. Morris K.V., Rossi J.J. // *Gene Ther.* 2006. V. 13. № 6. P. 553–558.
72. Zheng Z.M., Tang S., Tao M. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1058. P. 105–118.
73. ter Brake O., Berkhout B. // *J. Gene Med.* 2007. V. 9. № 9. P. 743–750.
74. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., et al. // *Nature.* 1996. V. 382. № 6593. P. 722–725.
75. Anderson J., Akkina R. // *Gene Ther.* 2007. V. 14. № 17. P. 1287–1297.
76. Qin X.F., An D.S., Chen I.S., Baltimore D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 1. P. 183–188.
77. Lee M.T., Coburn G.A., McClure M.O., Cullen B.R. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 22. P. 11964–11972.
78. Buttica C., Ciuffi A., Muñoz M., Thomas J., Bridge A., Pebernard S., Iggo R., Meylan P., Telenti A. // *Antivir. Ther.* 2003. V. 8. № 5. P. 373–377.
79. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., Lieberman J., Elledge S.J. // *Science.* 2008. V. 319. № 5865. P. 921–926.
80. Anderson J., Akkina R. // *Retrovirology.* 2005. V. 2. P. 53.
81. Banerjee A., Li M.J., Bauer G., Remling L., Lee N.S., Rossi J., Akkina R. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 1. P. 62–71.
82. An D.S., Donahue R.E., Kamata M., Poon B., Metzger M., Mao S.H., Bonifacino A., Krouse A.E., Darlix J.L., Baltimore D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 32. P. 13110–13115.
83. Li M.J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J.K., Anderson J., Akkina R., Rossi J.J. // *Mol. Ther.* 2005. V. 12. № 5. P. 900–909.
84. Tiemann K., Rossi J.J. // *EMBO Mol. Med.* 2009. V. 1. № 3. P. 142–151.
85. Anderson J., Li M.J., Palmer B., Remling L., Li S., Yam P., Yee J.K., Rossi J., Zaia J., Akkina R. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 6. P. 1182–1188.
86. Senzer N., Barve M., Kuhn J., Melnyk A., Beitsch P., Lazar M., Lifshitz S., Magee M., Oh J., Mill S.W., et al. // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. № 3. P. 679–686.
87. Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. // *Dev. Biol.* 2007. V. 302. № 1. P. 1–12.
88. Li C., Feng Y., Coukos G., Zhang L. // *AAPS J.* 2009. V. 11. № 4. P. 747–757.
89. Yu F., Yao H., Zhu P., Zhang X., Pan Q., Gong C., Huang Y., Hu X., Su F., Lieberman J., et al. // *Cell.* 2007. V. 131. № 6. P. 1109–1123.
90. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 39. P. 13944–13949.
91. Kota J., Chivukula R.R., O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Montgomery C.L., Hwang H.W., Chang T.C., Vivekanandan P., Torbenson M., Clark K.R., et al. // *Cell.* 2009. V. 137. № 6. P. 1005–1017.
92. Kumar M.S., Erkeland S.J., Pester R.E., Chen C.Y., Ebert M.S., Sharp P.A., Jacks T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 10. P. 3903–3908.
93. DiGiusto D.L., Krishnan A., Li L., Li H., Li S., Rao A., Mi S., Yam P., Stinson S., Kalos M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2010. V. 2. № 36. P. 36–43.
94. Yoshino S., Hara T., Weng J.S., Takahashi Y., Seiki M., Sakamoto T. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. 35590.
95. Palchaudhuri R., Hergenrother P.J. // *ACS Chem. Biol.* 2011. V. 6. № 1. P. 21–33.
96. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. № 23. P. 4090–4097.

УДК 577.2

Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии

Н. А. Орлова^{1,2}, С. В. Ковнир^{1,2}, И. И. Воробьев^{1,2*}, А. Г. Габибов², А. И. Воробьев³¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10³Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.2013

РЕФЕРАТ Рекомбинантный фактор свертывания крови VIII является одним из самых сложных для промышленного получения белков вследствие низкой эффективности транскрипции его гена, потери большей части полипептида фактора VIII при посттрансляционном процессинге в клетках и нестабильности секретированного белка. Улучшение медицинской помощи больным гемофилией А предполагает постоянное увеличение производства препаратов фактора VIII при повышающихся требованиях к качеству и вирусной безопасности конечного продукта. Более эффективные системы биосинтеза фактора VIII могут быть разработаны с учетом обнаруженных особенностей транскрипции гена фактора VIII в гетерологичных системах, посттрансляционного процессинга и циркуляции зрелого фактора VIII в кровотоке. В обзоре рассмотрены делеционные варианты фактора VIII, секретируемые культивируемыми клетками млекопитающих с большей эффективностью, а также перспективные способы получения лекарственных препаратов фактора VIII пролонгированного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фактор свертывания крови VIII, гемофилия А, гетерологичные системы экспрессии рекомбинантных белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FVIII – фактор свертывания крови VIII; BDD – делеция В-домена (B-domain deleted); ME – международная единица; FVIII:Ag – концентрация антигена FVIII; FVIII:C – прокоагуляционная активность FVIII; vWF – фактор фон Виллебранда. Буква «а» при номере соответствующего фактора свертывания означает активированный фактор.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор свертывания крови VIII (FVIII) – это неэнзиматический кофактор активированного фактора IX (FIXa), который при протеолитической активации образует с FIXa плотный нековалентный комплекс, связывающий и активирующий фактор X (FX). Делекции гена *FVIII* могут приводить к развитию гемофилии А – X-связанного рецессивного генетического заболевания с частотой встречаемости около 1 случая на 5000 мужчин. Приблизительно половина всех случаев гемофилии А вызвана инверсиями в интроне 22 гена *FVIII* [1], еще 5% – инверсиями в интроне 1. По состоянию на ноябрь 2012 года в базе данных HAMSTeRS (The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site) описано 2107 различных мутаций гена *FVIII*, проявляющихся как гемофилия А [2], в базе данных SHAMP (The CDC Hemophilia A Mutation Project) на июль 2012 года приведено 2537 мутаций [3].

Единственное эффективное лечение при гемофилии А – регулярно проводимая заместительная терапия препаратами FVIII. Традиционный источник FVIII – это донорская плазма крови, количество которой ограничено. Даже после тщательного скрининга заготовленной плазмы и множественных процедур инактивации вирусов при использовании плазмы в качестве сырья для получения терапевтических белков сохраняется риск передачи вирусных [4, 5] и прионных [6] инфекций. Рекомбинантный фактор VIII человека для терапии гемофилии А может быть получен при помощи культивируемых клеток млекопитающих или в молоке трансгенных животных.

ФУНКЦИИ ФАКТОРА VIII В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА

Плотный нековалентный комплекс FVIIIa и FIXa образуется на поверхности фосфолипидной мембраны и дополнительно включает молекулу FX, активируемую FIXa. FX покидает комплекс после активации

и запускает, в свою очередь, реакцию превращения протромбина в тромбин (FII в FIIa), который превращает фибриноген в основной компонент тромба – фибрин (рис. 1). Тройной комплекс факторов свертывания FIXa, FVIIIa и FX, связанных с фосфолипидной мембраной, обычно называемый «X-аза», или «теназа», представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания

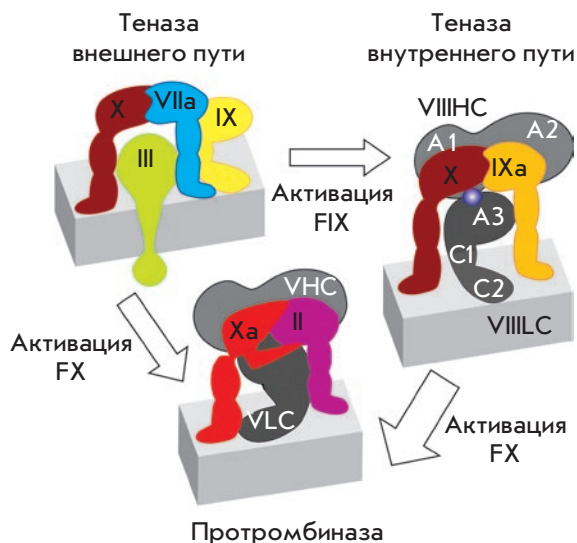


Рис. 1. Схема сборки теназного комплекса на мембране клеток. Римскими цифрами обозначены факторы свертывания крови в форме проферментов, римскими цифрами с индексом «а» – активированные ферменты. Факторы свертывания ассоциированы с мембраной, фактор III – трансмембранный белок. VIIIHC – тяжелая цепь фактора VIII, VIIIHC – легкая цепь фактора VIII, белым шрифтом обозначены домены A1, A2, A3, C1, C2 в составе цепей FVIII. VHC – тяжелая цепь фактора V, VLC – легкая цепь фактора V. Толщина белых стрелок соответствует различиям в скорости реакций

крови. Функционально аналогичный теназе комплекс может быть описан для внешнего пути свертывания (FIII, FVIIa, FIX, FX), однако его энзиматическая эффективность значительно ниже, чем у «внутренней» теназы. Уникальной особенностью теназного комплекса является огромная степень усиления каталитической эффективности малоактивной протеиназы FIXa, сообщаемая FVIIIa, – около пяти порядков [7]. Подобное усиление обусловлено прежде всего изменением конформации активного сайта FIXa при связывании с FVIIIa [8]. Гомолог фактора VIII – фактор V – аналогичным образом потенцирует активность FXa в составе комплекса протромбиназы с коэффициентом усиления каталитической эффективности ×240.

Функциональную активность FVIII измеряют при коагуляции плазмы крови с удаленным эндогенным FVIII и добавленным исследуемым раствором FVIII. Стабильность FVIII в кровотоке изучают на модельных животных с поврежденным или удаленным геном FVIII. Животные модели гемофилии A рассмотрены в обзорной статье [9].

СТРУКТУРА ГЕНА FVIII И ОСОБЕННОСТИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

Ген FVIII, локализованный на большом плече X-хромосомы, занимает участок длиной порядка 186 т.п.н. и состоит из 26 экзонов размером от 69 до 3106 п.н. и интронов размером от 207 п.н. до 32.4 т.п.н. Общая длина кодирующей последовательности этого гена равна 9 т.п.н. [10, 11] (рис. 2). Экспрессия гена FVIII тканеспецифична и фиксируется преимущественно в клетках печени [12–14]. Наибольший уровень мРНК и белка FVIII выявлен в клетках эндотелиальной выстилки синусоидных капилляров (синусоидов) печени [15, 16], значимые количества FVIII присутствуют также в гепатоцитах и клетках Купфера (резидентных макрофагах выстилки синусоидов).

Таблица 1. Доменная организация фактора VIII с указанием границ доменов

A1	a1	A2	a2	B	a3	A3	C1	C2	Источник
1–329	331–372	380–711	700–740	741–1648	1649–1689	1649–2019	2020–2172	2173–2332	[21]
1–336	337–372	372–710	711–740	741–1648	1649–1689	1690–2019	2020–2172	2173–2332	[22]
1–336		372–710		741–1648		1896–2019	2020–2172	2173–2332	[23]
1–336	337–374	375–719	720–740		1649–1690	1691–2025			[24]

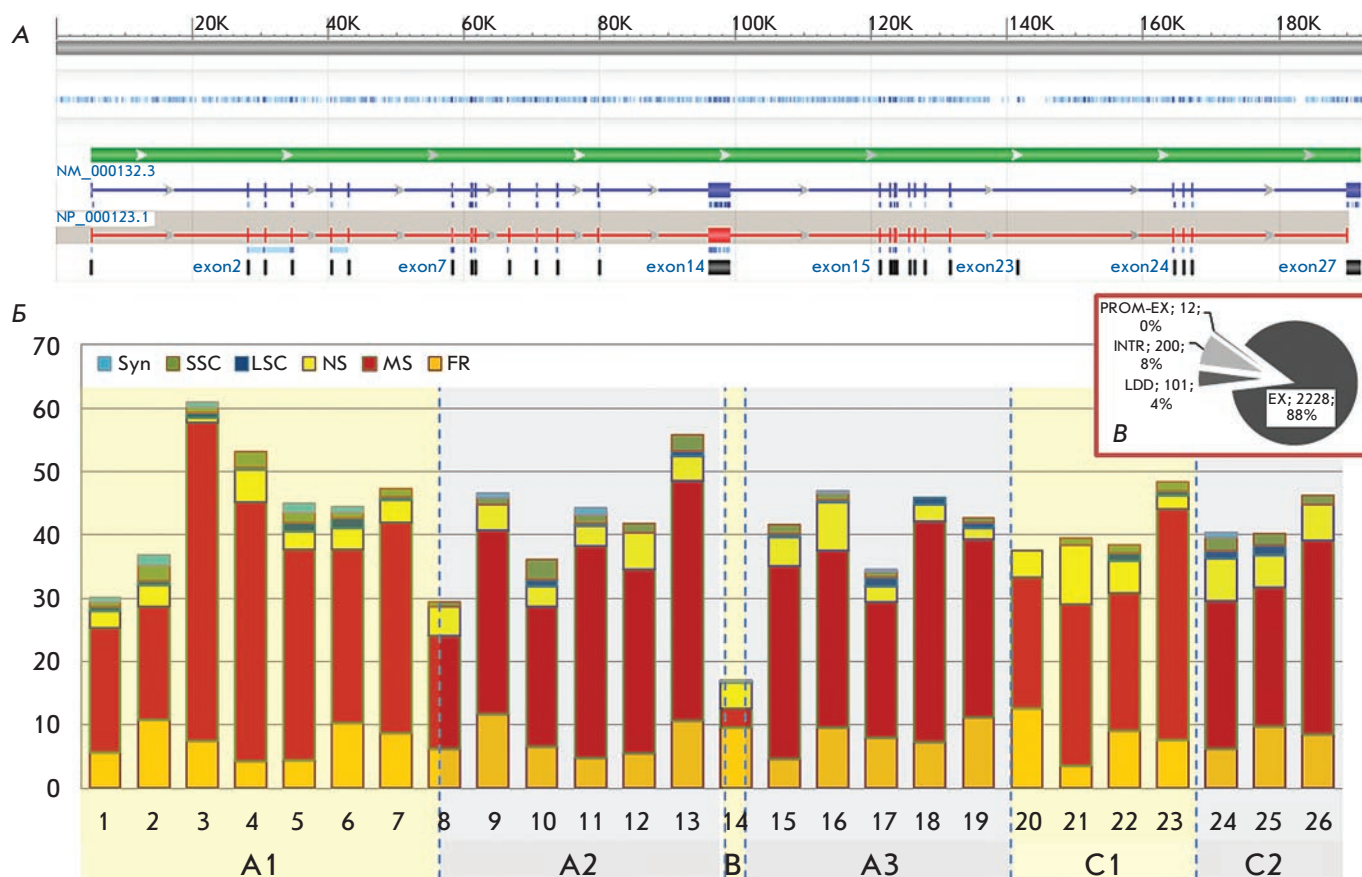


Рис. 2. Структура гена *FVIII* и частота мутаций, вызывающих гемофилию А. А – Ген *FVIII* на хромосоме X человека, референсная последовательность NCBI: NG_011403.1. Транскрибируются два продукта альтернативного сплайсинга. Функциональный полноразмерный белок FVIII кодируется транскрипционным вариантом 1, референсная последовательность мРНК NM_000132.3, референсная последовательность белка NP_000123.1. Б – Варианты мутаций гена *FVIII* в экзонах по данным [3]. Число мутаций на 100 п.н. кодирующей ДНК. Обозначения: Syn – синонимичная замена; NS – нонсенс-мутация; MS – миссенс-мутация; FR – сдвиг рамки; SSC – небольшая структурная перестройка (в рамке, <50 п.н.); LSC – большая структурная перестройка (>50 п.н.). Номера столбцов гистограммы соответствуют номерам экзонов. Соответствующие домены белка FVIII указаны под номерами экзонов. Длина экзона 1 в мРНК 314 п.н., при расчетах использована длина кодирующей части – 143 п.н. (включая сигнальный пептид); длина экзона 26 в мРНК 1965 п.н., при расчетах использована длина кодирующей части 156 п.н. Длины остальных экзонов (п.н.): 2 – 122, 3 – 123, 4 – 213, 5 – 69, 6 – 117, 7 – 222, 8 – 262, 9 – 172, 10 – 94, 11 – 215, 12 – 151, 13 – 210, 14 – 3106, 15 – 154, 16 – 213, 17 – 229, 18 – 183, 19 – 117, 20 – 72, 21 – 86, 22 – 156, 23 – 145, 24 – 149, 25 – 177. В – Варианты мутаций гена *FVIII*. Обозначения: LDD – большие делеции и дубликации в одном или нескольких доменах FVIII; INTR – нарушения сайтов сплайсинга; PROM-EX – мутации в области промотора и делеции промотор-эксон; EX – мутации в экзонах. Использованы данные [3] на 18.07.2012

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА

Зрелый полипептид фактора VIII состоит из 2332 аминокислотных остатков (максимальная длина) и включает структурные домены А1–А2–В–А3–С1–С2 [17, 18] (рис. 2). На границах А-доменов расположены три кислых субдомена, обозначаемые как а1–а3 – А1(а1)–А2(а2)–В-(а3)А3–С1–С2 и играющие важную роль во взаимодействии FVIII с другими белками, в частности с тромбином. Мута-

ции в этих субдоменах приводят к снижению уровня активации фактора VIII тромбином [19, 20]. На настоящий момент сохраняются некоторые разночтения в определении точных границ доменов FVIII, наиболее распространенные варианты границ приведены в табл. 1.

А-домены FVIII на 30% гомологичны друг другу, А-доменам фактора V и медьсвязывающему белку плазмы человека – церулоплазмину (рис. 3). Домен

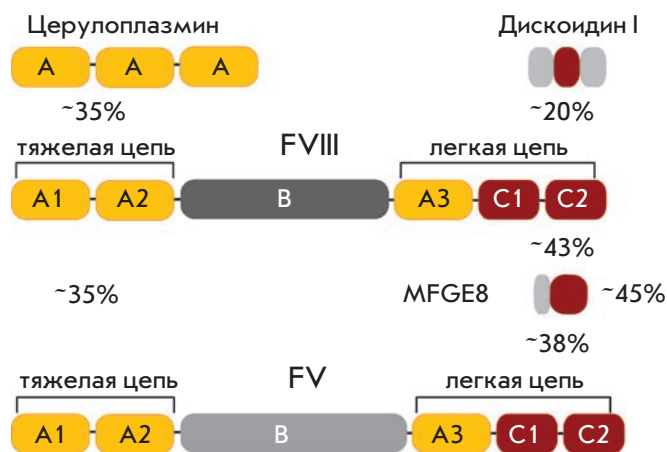


Рис. 3. Доменная организация гомологов FVIII. Цифрами указан уровень гомологии аминокислот (%) для групп доменов. Дискоидин I из *Dictyostelium discoideum*, остальные белки – *H. sapiens*

A1 FVIII координирует ион меди [17, 25–27] (рис. 4). Участок 558–565 домена A2 определяет связывание фактора IXa и его конформационную перестройку в составе теназы [28] (рис. 5).

Домены C1 и C2, входящие в состав легкой цепи зрелого FVIII, гомологичны доменам C1 и C2 FV [29], С-концевым доменам белка MFG8 (milk fat globule EGF factor 8, lactadherin) [30, 31] и фрагменту дискоидина I [32] (рис. 3). Эти домены обладают способностью связывать гликоконъюгаты и кислые фосфолипиды [33]. Домен C2 в FVIII также необходим для связывания с фактором фон Виллебранда (vWF) и селективного взаимодействия с фосфатидилсеринем в мембранах клеток [34] (рис. 5).

Домен В, кодируемый одним протяженным экзоном, частично выщепляется из состава зрелого белка. Домен В содержит 25 потенциальных сайтов N-гликозилирования, 16–19 из которых фактически содержат N-связанные олигосахариды при значительном уровне микрогетерогенности. Гомология В-доменов FVIII человека и мыши невысока, однако у обоих видов эти домены высокогликозилированы, что может свидетельствовать о значимости этой модификации для посттрансляционного процессинга белка [35].

Исходя из значительной гомологии факторов V и VIII, высказывается предположение об эволюционном происхождении гена *FVIII* в результате дубликации. Интересно, что функциональные домены А и С этих белков консервативны, а сходство доменов В ограничивается высокой степенью гликозилирования, что также свидетельствует о функциональной

значимости высокой плотности олигосахаридных групп в домене В FVIII [17, 25–27].

Высокогликозилированный В-домен может участвовать в процессах внутриклеточного транспорта предшественника FVIII и его процессинге, хотя по многочисленным экспериментальным данным удаление области В-домена приводило к увеличению уровня секреции функционально активного FVIII [36, 37].

КООРДИНИРОВАННЫЕ ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

Взаимодействие полипептидной цепи FVIII с ионами металлов определяет структурную целостность зрелого белка и его кофакторную функцию. Наличие ионов меди в составе FVIII показано атомно-адсорбционной спектрометрией; при диссоциации цепей FVIII ионы меди также полностью диссоциируют [38]. Реассоциация разделенных цепей FVIII, в свою очередь, возможна только в присутствии солей меди [39]. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) установлено, что координированные ионы меди в составе FVIII восстановлены до состояния +1 (Cu^+) [40]. В кристаллах делеционного варианта FVIII (вариант BDD SQ) зафиксировано присутствие двух координированных ионов меди, образующих прямые контакты с остатками H267, C310, H315 и H1954, C2000, H2005; т.е. два полноценных сайта связывания иона меди типа I [41] (рис. 4). Оба кармана связывания ионов меди находились вблизи поверхности контакта доменов A1 и A3, однако не участвовали непосредственно в образовании нековалентных связей между доменами. Одновременно с этим, доказательства функциональной значимости получены только для сайта связывания ионов меди в домене A1 как при помощи точечных замен остатков цистеина [40], так и при прямых наблюдениях за координированием ионов меди методом FRET [39]. Дополнительным аргументом в пользу физиологической значимости сайта связывания меди в домене A1 служит мутация C310F в гене *FVIII* [2], которая приводит к тяжелой форме гемофилии А.

Для восстановления прокоагулянтной активности FVIII при диссоциации-реассоциации цепей необходимы как ионы меди, так и ионы кальция или марганца [43, 44]. Ионы кальция или марганца не влияют на димеризацию цепей, но способствуют приобретению активной конформации у восстановленной молекулы FVIII [39], связываясь с сайтами, расположенными на обеих цепях белка [45, 46]. Основной сайт связывания Ca^{2+} локализован в A1-домене (область 108–124) [45] и гомологичен соответствующему сайту в молекуле FV [47]. Методом аланинового сканирования установлено, что связывание Ca^{2+} опосредовано остатками E110, D116, E122, D125, D126, а взаимодействии с Mn^{2+} – остатками D116 и D125 [48].

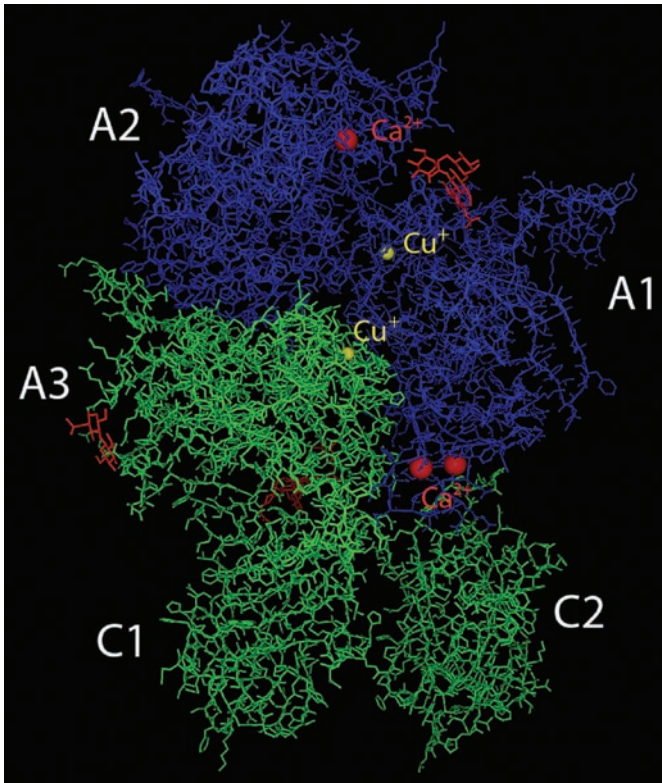


Рис. 4. Пространственная структура делеционного варианта FVIII по данным [42]. Коровые остатки N-связанных олигосахаридов отмечены красным, тяжелая цепь FVIII – синим, легкая цепь – зеленым

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА FVIII

FVIII синтезируется в печени, что подтверждается излечением от гемофилии А при пересадке печени. При выделении и очистке популяций клеток печени установлено, что секреция существенных количеств FVIII (0.07 МЕ/млн клеток/день) наблюдается в первичной культуре эндотелиальных клеток синусоидов печени [15]. Успешные попытки иммортализации культивируемых эндотелиальных клеток синусоидов печени на настоящий момент не описаны, поэтому все экспериментальные сведения об особенностях биосинтеза FVIII получены при помощи гетерологичных систем экспрессии, обычно имеющих искусственно увеличенную продуктивность [49].

Транслокация растущей полипептидной цепи FVIII в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭПР), процессинг сигнального пептида длиной 19 аминокислот, а также первичные события формирования дисульфидных связей и присоединения высокоманнозных ядер N-связанных олигосахаридов к цепи FVIII, по-видимому, не лимитируют общую скорость

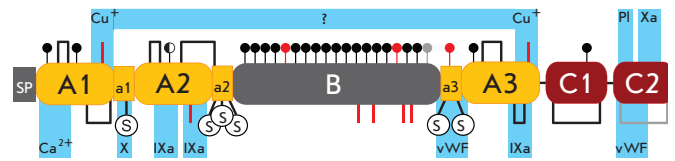


Рис. 5. Схема расположения сайтов посттрансляционных модификаций FVIII. Кружками обозначены сайты N-гликозилирования. Черные кружки – занятые сайты, черно-белый кружок – частично занятый сайт, серый кружок – предположительно занятый сайт, красные кружки – незанятые сайты. Скобками обозначены дисульфидные связи, серая скобка – предположительная дисульфидная связь. Красные вертикальные линии – восстановленные остатки цистеина, состояние остатков цистеина в составе B-домена неизвестно. S – сульфатированные остатки тирозина. Голубым отмечены области взаимодействия с соответствующими факторами свертывания крови, фосфолипидами (PI), фактором фон Виллебранда (vWF) и ионами меди. SP – сигнальный пептид и пропептид

его биосинтеза и подробно описаны [47]. В то же время последующие события редактирования олигосахаридных цепей, дисульфид-изомеризации и фолдинга молекул FVIII могут приводить к перегрузке соответствующих ферментных групп клетки и вызывать активацию систем удержания некорректно процессированных белков в ЭПР или систем рециклинга таких белков. Считается, что общая скорость секреции FVIII лимитирована именно транслокацией предшественника FVIII из ЭПР в аппарат Гольджи; полипептид FVIII может проводить в ЭПР от 15 мин до нескольких дней.

N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

После первичного N-гликозилирования цепи FVIII и отщепления двух первых остатков глюкозы из олигосахаридных групп гликозидазами I и II (GTI, GTII) полипептид FVIII связывается с лектинами кальнексином (CNX) и кальретинулином (CRT), предотвращающими секрецию незрелого белка [50] (рис. 6). В норме после удаления третьего остатка глюкозы белок освобождается из комплекса с CNX и CRT и транспортируется в аппарат Гольджи. При этом несвернутый или неправильно свернутый FVIII остается в ЭПР, где подвергается реглюкозилированию ферментом UGT (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase) [51], вновь связывается с CNX и CRT и подвергается повторному укорачиванию GTII (так называемый кальнексиновый цикл).

Неправильно свернутые молекулы FVIII, как и другие белки, направляются из ЭПР в протеасомы

цитозоля по пути ERAD (ER-associated degradation), при этом извлечение полипептида из кальнексинового цикла опосредовано специальным белком EDEM [28]. В экспериментах по вытеснению метки (pulse-chase) с инактивацией протеасом лактацистином [50] показано, что значительная часть FVIII действительно проходит деградацию по пути ERAD вместо транслокации в комплекс Гольджи, однако инактивация протеасом увеличивала количество внутриклеточного FVIII, но не его концентрацию в культуральной среде. Таким образом, путь ERAD сам по себе не вымывает существенных количеств FVIII из просвета ЭПР и не может быть причиной ограниченного перехода FVIII из ЭПР в аппарат Гольджи. Поскольку основная часть N-связанных олигосахаридов в молекуле FVIII локализована в В-домене, делеционные варианты FVIII менее подвержены удерживанию в ЭПР в кальнексиневом цикле, что частично объясняет увеличенный уровень их секреции.

ФОРМИРОВАНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Согласно результатам моделирования пространственной структуры FVIII и большинства экспериментальных работ, молекула FVIII содержит восемь дисульфидных связей – по две в доменах А, по одной в доменах С и три восстановленных остатка Cys в доменах А1, А2, А3 (рис. 5). Определенных данных о состоянии остатков цистеина в составе В-домена нет. Семь из восьми дисульфидных связей расположены внутри полипептидной глобулы, а связь С1899–С1903 (домен А3) экспонирована на поверхности. При проведении группой Пайпа серии замен остатков цистеина на остатки серина или глицина установили, что все семь неэкспонированных дисульфидных связей необходимы для поддержания структурной целостности молекулы FVIII, а удаление связи 1899–1903 улучшает секрецию FVIII в 2 раза, не меняя его функциональной активности [52]. Весьма вероятно, что удаление единственной экспонированной дисульфидной связи приводит к подавлению удерживания FVIII в ЭПР, связанного с контролем работы дисульфидизомераз [53], однако, конкретный механизм такого контроля в отношении FVIII и участвующие в нем белки практически не изучены.

ФОЛДИНГ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ШАПЕРОНАМИ ЭПР

Фактор VIII в просвете ЭПР образует прочный комплекс с главным шапероном ЭПР GRP78 (glucose-regulated protein MW 78.000), также называемым BiP (immunoglobulin-binding protein) [54], одним из важных компонентов сигнального пути UPR (unfolded protein response). Обычно синтез BiP индуцируется

при голодании клеток по глюкозе, ингибировании N-гликозилирования и в присутствии некорректно фолдированных белков в ЭПР [55], в частности, при сверхэкспрессии FVIII [56]. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия FVIII человека в культивируемых клетках вызывает общую активацию UPR, наблюдаемую не только как положительную регуляцию BiP, но и как активацию гена *ERSE* и увеличение уровня сплайсинга мРНК *ХВР1* [57]. Таким образом, BiP может быть не единственным шапероном, инициирующим активацию UPR при попадании больших количеств FVIII в просвет ЭПР.

BiP в комплексе с полипептидом обладает АТФ-азной активностью, гидролиз АТФ необходим для распада комплекса. Отделение FVIII от BiP и секреция требуют необычно высоких затрат АТФ [58].

Гомолог FVIII, фактор V, в отличие от FVIII, не взаимодействует с BiP. При помощи серии химерных белков FVIII-FV был идентифицирован сайт связывания FVIII с BiP – гидрофобный β-лист в составе домена А1, лежащий вблизи остатка С310, который входит в состав сайта связывания иона меди типа I [40, 59]. BiP образует прямые контакты с гидрофобными аминокислотами, и точечная мутация F309S внутри этого β-листа увеличила секрецию FVIII в 3 раза, что коррелировало со снижением затрат АТФ [59]. Поскольку остаток F309 соседствует с С310 – ключевым остатком сайта координирования меди в домене А1, можно предположить, что BiP участвует и в присоединении ионов меди к FVIII.

Около трети молекул FVIII в ЭПР ассоциированы между собой в нековалентные высокомолекулярные агрегаты. Снижающая агрегацию замена участка FVIII 227–336 на гомологичный участок FV также уменьшает его аффинность к BiP и увеличивает секрецию [60]. Возможно, функциональное значение комплекса FVIII-BiP состоит преимущественно в удержании FVIII в ЭПР, а не в обеспечении эффективного фолдинга FVIII перед транслокацией в аппарат Гольджи.

ТРАНСПОРТ FVIII ИЗ ЭПР В АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Транспорт полипептида FVIII из ЭПР в Гольджи проходит через промежуточный компартмент ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) (рис. 6). FVIII и FV рекрутируются в этот компартмент, связываясь с трансмембранным белком (карго-рецептором) ERGIC-53, также называемым LMAN1 (lectin, mannose-binding protein 1), обеспечивающим маннозоселективное кальций-зависимое связывание и транспорт гликопротеинов из ЭПР в аппарат Гольджи [61].

Мутации, приводящие к утрате функции LMAN1 или нарушающие взаимодействие LMAN1 с компо-

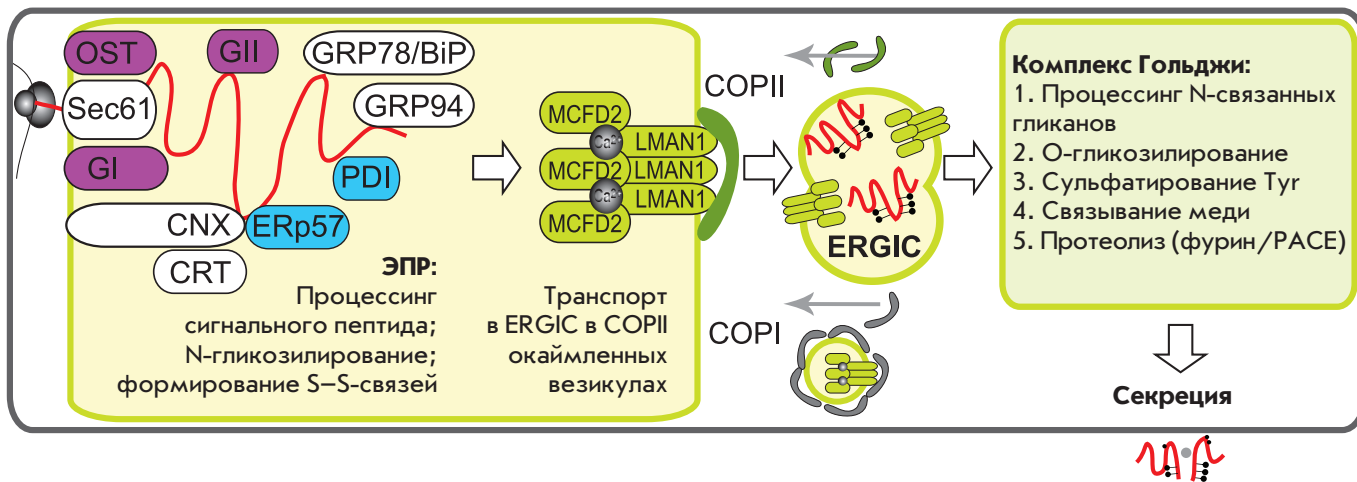


Рис. 6. Схема внутриклеточного транспорта секреторируемого полипептида FVIII. OST – олигосахарилтрансфераза, Sec61 – белокпроводящий канал, GI и GII – глюкозидазы I и II; CNX – кальнексин, CRT – кальретикулин, GRP78/BiP – glucose regulated protein 78 / immunoglobulin-binding protein; GRP94 – glucose regulated protein 94; PDI, ERp57 – дисульфидизомеразы; MCFD2 – multiple coagulation factor deficiency protein 2; LMAN1 – маннозосвязывающий лектин 1; COPI, COPII – белки окаймленных везикул I и II; ERGIC – промежуточный компартмент

нением транспортного комплекса MCFD2 (multiple coagulation factor deficiency protein 2), вызывают наследственную коагулопатию – комбинированный дефицит факторов V и VIII [62–64]. Уровень FVIII в плазме больных с мутантным LMAN1 снижается до 5–30% от нормы [65].

Методом химических сшивок доказан транспорт четырех белков – FV, FVIII и белков лизосом – катепсинов catC и catZ – через промежуточный компартмент с участием комплекса LMAN1–MCFD2 [66, 67]. Ряд других белков при транспорте взаимодействует с LMAN1, но не с MCFD2 [68]. При помощи поперечных сшивок белков обнаружено, что 5–20% общего внутриклеточного FVIII находится в комплексе с LMAN1 и MCFD2 [69]. Для образования комплекса FVIII с обоими партнерами необходимы ионы кальция, при этом комплекс FVIII–MCFD2 может образовываться независимо от LMAN1. Остается неясным, возможно ли прямое взаимодействие FVIII и LMAN1, обнаруженное для катепсинов catC и catZ [70], или комплекс FVIII–LMAN1 образуется только при участии MCFD2. Специфический мотив FVIII, который узнается карго-рецептором, не установлен. Теоретически такой мотив должен включать конформационный эпитоп и углеводный компонент (для того, чтобы транспорту подвергались только правильно фолдированные и посттрансляционно модифицированные белки). Мотив связывания LMAN1 был экспериментально найден в молекуле профермента catZ, он содержал несколько близко расположенных

N-гликанов [37], однако гомологичные ему участки в FVIII и FV отсутствуют.

FV и FVIII имеют сходную доменную структуру, включающую негомологичные, но в обоих случаях содержащие множество сайтов N-гликозилирования В-домены. Поскольку у FVIII с делецией В-домены снижена эффективность связывания с комплексом LMAN1–MCFD2, предполагают, что LMAN1 взаимодействует преимущественно с В-доменами [71]. Между тем, блокирование N-гликозилирования не вызывает прекращения образования комплекса FVIII с карго-рецептором [69], т.е. во взаимодействии FVIII с карго-рецептором участвует не только углеводная часть молекулы, но и полипептидная цепь.

Комплекс LMAN1–MCFD2 специфически рекрутирует FVIII и FV из ЭПР в везикулы COPII (coat protein II), которые отделяются от ЭПР и после этого связываются с ERGIC (рис. 6). Механизм освобождения полипептида FVIII из комплекса LMAN1–MCFD2 при транспорте не установлен; предполагается, что оно осуществляется за счет изменения локального pH и концентрации кальция [71]. Белки комплекса COPII возвращаются в ЭПР вне везикул, комплексы ERGIC подвергаются ретроградному транспорту в составе везикул COPI, а дальнейший транспорт FVIII проходит, по-видимому, в везикулах неизвестного состава либо при помощи транспортных контейнеров, ассоциированных с микротрубочками. Появление молекул FVIII в аппарате Гольджи происходит путем образования новых цистерн *цис*-Гольджи [71–73].

ПРОЦЕССИНГ FVIII В АППАРАТЕ ГОЛЬДЖИ

В аппарате Гольджи осуществляется модификация высокоманнозных N-гликанов молекулы FVIII, O-гликозилирование и сульфатирование остатков тирозина, протекающее в *транс*-Гольджи. В FVIII человека обнаружено шесть активных сайтов сульфатирования остатков тирозина в позициях 346, 718, 719, 723, 1664, 1680, расположенных преимущественно в области кислых субдоменов $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и окружающих точки расщепления FVIII тромбином. Все шесть сайтов сульфатирования необходимы для полной активности фактора VIII; ингибирование сульфатирования приводило к 5-кратному падению функциональной активности FVIII [74]. Также показано, что сульфатирование остатка Y1680 необходимо для эффективного взаимодействия FVIII с фактором фон Виллебрандта. Природная мутация Y1680F проявляется как гемофилия A средней тяжести. FVIII у пациентов, обладающих данной мутацией, сохраняет нормальную активность, но имеет уменьшенное время полураспада [75]. При помощи сайт-направленного мутагенеза группой Кауфмана было показано, что присутствие сульфатированных остатков в позициях 346 и 1664 увеличивает скорость активации FVIII тромбином, а сульфатирование остатков 718, 719, 723 увеличивает удельную активность FVIIIa в теназном комплексе, и подтверждена необходимость сульфатирования остатка 1680 для образования комплекса с фактором фон Виллебрандта [76].

Последней стадией процессинга FVIII в *транс*-Гольджи перед секрецией является ограниченный протеолиз одноцепочечного предшественника по остаткам R1313 и R1648 с образованием легкой и тяжелой цепи [22]. Оба сайта протеолитического процессинга соответствуют мотиву Arg-X-X-Arg, расщепляемому протеазой фурин/PACE (paired basic amino acid cleavage enzyme), однако конкретная сигнальная протеаза семейства PACE, ответственная за процессинг FVIII, не установлена.

ФАКТОР VIII В КРОВТОКЕ

В плазме крови зрелый природный FVIII, представленный серией форм с молекулярной массой 170–280 кДа, находится в концентрации 0.1–0.2 мкг/мл [77]. Практически весь FVIII в плазме входит в состав комплекса с шапероном – фактором фон Виллебрандта, который выделяют клетки эндотелия сосудов. Районы FVIII, ответственные за связывание с этим шапероном, картированы в легкой цепи – в кислом субдомене $\alpha 3$ [78], доменах C2 [34, 79] и C1 [80]. Фактор фон Виллебрандта стабилизирует FVIII в кровотоке и является его ключевым регулятором – позволяет тромбину активировать связанный

FVIII [36, 81, 82] и препятствует расщеплению молекул неактивированного FVIII протеазами FXa [83] и активированного белка C (activated protein C, APC) [84–86]. Кроме того, vWF предотвращает неспецифическое связывание FVIII с мембранами клеток эндотелия сосудов [61] и тромбоцитов [87]. В опытах *in vitro* показано, что vWF способствует ассоциации цепей FVIII и сохранению прокоагулянтной активности в кондиционированной среде клеток-продуцентов FVIII [44, 49], аналогичные данные получены для реассоциации цепей FVIII в растворе [43, 44]. Константа диссоциации комплекса vWF–FVIII составляет 0.2–0.4 нМ, практическое равновесие при образовании комплекса *in vitro* достигается за секунды [61, 88, 89].

У значительной части больных гемофилией A в кровотоке появляются ингибиторы вводимого экзогенного FVIII, блокирующие его прокоагуляционную активность [90]. Известны также случаи развития «приобретенной гемофилии A» у пациентов с нормальным геном FVIII за счет появления антител на аутологичный FVIII [91]. Этиология возникновения ингибиторных антител в целом неясна, в настоящий момент обнаружены определенные корреляции между появлением ингибиторных антител и HLA-гаплотипом [92] или характером мутации гена фактора VIII [93]. Среди ингибиторных антител преобладают антитела класса IgG [94]. Установлено, что аллоантитела связываются преимущественно с доменами A2 или C2 фактора VIII и препятствуют его взаимодействию с фактором FIX, тогда как аутоантитела связываются преимущественно с C2-доменом FVIII, что предположительно приводит к блокированию его взаимодействия с фосфолипидами и vWF [95]. Кроме того, показано, что антитела к фактору VIII способны к специфическому гидролизу FVIII [96], причем протеолитическая активность аллоантител прямо пропорциональна уровню ингибитора FVIII [97].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ FVIII С FIXa, FX И ФОСФОЛИПИДАМИ

Белок-белковые контакты FVIII (или FVIIIa) с FIXa в составе теназы обеспечиваются двумя различными областями, при этом основная контактная поверхность расположена на легкой цепи FVIII (рис. 1). Свободная легкая цепь имеет сходную с полноразмерным FVIII аффинность к FIXa (K_d 14–50 нМ [67, 98], а у полноразмерного FVIII K_d ~ 2–20 нМ [99, 100]). Основным сайтом взаимодействия FVIII и FIXa представляет собой короткий пептид 1803–1810 [101], второй сайт взаимодействия FVIII и FIXa – область 558–565 [67]. Область прямого взаимодействия FVIII и FX обнаружена в кислом C-концевом субдомене домена

A1 (337–372) [71, 77], но, скорее всего, это взаимодействие не имеет существенного значения для работы теназного комплекса. Присутствие фосфолипидов необходимо для осуществления кофакторной функции FVIII [7, 102, 103]. *In vivo* FVIII взаимодействует с фосфолипидами активированных тромбоцитов и клеток поврежденного эндотелия. Показано, что оба неэнзиматических кофактора системы свертывания – FVIII и FV связываются с фосфатидилсерин [38, 104]. Фактор VIII преимущественно связывается с мицеллами, содержащими 15–25% фосфатидилсерина, при этом константа диссоциации достигает 2–4 нМ [89, 99, 102]. Содержание фосфатидилсерина в мембране тромбоцитов может увеличиваться при их активации с 2 до 13%, привлекая таким образом FVIII. Активация FVIII в 10 раз повышает его аффинность к фосфолипидам [105]. Сайт связывания фосфолипидов локализован в легкой цепи FVIII в области домена C2 [106] (рис. 5).

АКТИВАЦИЯ FVIII И ИНАКТИВАЦИЯ FVIIIa

Активация FVIII *in vivo* осуществляется тромбином или FXa (рис. 7) и состоит во внесении протеолитических разрывов в нескольких точках. При активации FVIII тромбином разрывы вносятся в позиции R372, R740 и R1689 [107] и приводят к отделению В-домена, разделению тяжелой цепи на несвязанные ковалентно домены A1 и A2, а также к удалению короткой кислой области a3 перед доменом A3. В ряде источников область a3 называется активационным пептидом FVIII, однако продуктивная активация FVIII не может быть сведена к удалению области a3 из состава молекулы. Активация FVIII фактором FXa приводит к разрыву полипептидной цепи FVIII по указанным сайтам и двум или трем дополнительным разрывам в положении R1721, R336 и K36 [63, 107]. Продуктивное взаимодействие FVIII с тромбином опосредовано остатками сульфатированного тирозина в FVIII, а активация FVIII фактором FXa практически нечувствительна к замене Y → F в сайтах сульфатирования [76]. FVIIIa, полученный активацией FXa, образует значительно менее продуктивную теназу, чем FVIIIa, активированный тромбином [108]; таким образом, активацию FVIII при помощи FXa можно рассматривать как побочный процесс при инактивации FVIIIa.

Инактивация FVIIIa может протекать спонтанно и сводиться к отделению от молекулы FVIIIa домена A2 тяжелой цепи, не связанного с остальными доменами FVIII ковалентными связями [109, 110]. В настоящий момент выделяют два специфических инактиватора FVIIIa – APC и FXa. APC расщепляет FVIIIa в положении R562 и R336 [71], при этом разрушается область контакта FVIIIa и FIXa и дестабилизируется взаимодействие доменов A1 и A2.

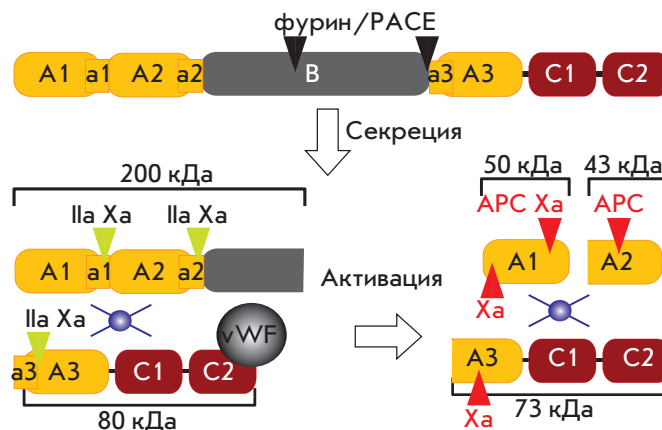


Рис. 7. Протеолитический процессинг FVIII. Черные треугольники – сайты процессинга протеазами семейства фурин/ PACE, зеленые треугольники – сайты расщепления FVIII при активации, красные треугольники – сайты расщепления FVIII и FVIIIa при инактивации. Синим кружком обозначен координированный ион меди

Инактивация FVIIIa при помощи FXa, по-видимому, происходит *in vivo* более активно, чем инактивация APC, и представляет собой внесение разрывов в позициях R336 и K36 [73], что приводит к дестабилизации домена A1 и ускоренному отделению свободного домена A2.

УДАЛЕНИЕ FVIII ИЗ СИСТЕМНОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ

Комплекс FVIII с vWF в основном выводится из циркуляции специализированным клиренсным рецептором LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), представленным на мембране гепатоцитов [111–113]. В экспериментах *in vivo* на мышах наблюдали 3.3-кратное увеличение времени полувыведения FVIII при блокировании LRP ассоциированным с рецептором белком 39 кДа (RAP), который связывается с LRP с высокой аффинностью [111]. Во взаимодействии фактора VIII с LRP участвуют три сайта – в C2-домене [112], в A3-домене (1804–1834) [101] и в A2-домене (484–509) [111]. Множественные сайты взаимодействия FVIII с LRP обеспечивают эффективное удаление из циркуляции свободных цепей и отщепленного домена A2. Присутствие vWF в комплексе с FVIII в районе домена C2 предотвращает взаимодействие этого домена с LRP, отчего аффинность к LRP снижается на 90% [112]. *In vivo*-взаимодействие FVIII и его фрагментов с LRP опосредуется гепарансульфатпротеогликанами (HSPG), взаимодействующими с областью 558–565 в домене A2 [114].

Таблица 2. Лекарственные препараты рекомбинантного FVIII

Название	Kogenate®, Helixate®	Kogenate FS®, Kogenate Bayer®, Helixate FS®, Helixate NexGen®	Recombinate®, Bioclolate®	Advate®	ReFacto®	Xyntha®, ReFacto AF®
Производитель	Bayer Healthcare		Baxter		Pfizer	
Поколение	1	2	1	3	2	3
Разрешение на продажу в США	1993	2000	1992	2003	2000	2008
Линия-производитель	ВНК		СНО		СНО	
Гетерологические гены	FVIII		FVIII, vWF		FVIII BDD SQ	
Белки в культуральной среде	Белки плазмы крови человека		БСА, апро- тинин	Нет	БСА	Нет
Иммуноаффинная хроматография	Да		Да		Да	Нет
Стабилизатор	ЧСА	Сахароза	ЧСА	Маннитол, трегалоза	Сахароза	
Вирус-инактивация	ДР		Пастеризация	ДР	ДР	ДР, НФ

Примечание. ЧСА – человеческий сывороточный альбумин, БСА – бычий сывороточный альбумин, ДР – обработка детергентом и растворителем, НФ – нанофильтрация.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ FVIII ДЛЯ ТЕРАПИИ ГЕМОФИЛИИ

Лекарственные препараты рекомбинантного полноразмерного FVIII были практически одновременно разработаны биотехнологическими компаниями Genetics Institute и Genentech на основе систем экспрессии гена *FVIII* в клетках СНО и ВНК [66, 115] и одобрены для клинического применения уже в 1992–1993 годах с международным непатентованным названием «октоког альфа». Рекомбинантный FVIII, секретируемый клетками СНО в комплексе с рекомбинантным vWF [49, 77], выпущен под торговыми названиями Recombinate® и Bioclolate®. Рекомбинантный FVIII, секретируемый клетками ВНК в культуральную среду, содержащую природный vWF [115], получил торговые названия Kogenate® и Helixate® (табл. 2).

В настоящий момент различают три поколения лекарственных препаратов рекомбинантных факторов свертывания крови [68]: препараты первого поколения содержат человеческий сывороточный альбумин и контактируют с веществами животного происхождения в процессе производства; в препаратах второго поколения готовая лекарственная форма не содержит альбумина в качестве вспомогательного вещества; в препаратах третьего поколения контакт с вещества-

ми животного происхождения и компонентами донорской плазмы исключен во всем процессе производства. Предположительно, минимизация использования компонентов плазмы и белков животного происхождения может уменьшить риск инфицирования пациентов вирусами и прионами [116]. В настоящее время нет ни одного подтвержденного факта передачи инфекционных агентов при использовании рекомбинантных препаратов FVIII первого и второго поколения.

Схема получения препаратов полноразмерного рекомбинантного FVIII включает несколько стадий ионообменной хроматографии, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных моноклональных антител, инактивацию вирусов при помощи обработки растворителем и детергентом или пастеризацией в присутствии детергента [67, 117]. Препараты рекомбинантного FVIII неизбежно содержат следовые количества белков клеток-производителей и мышинового IgG, поэтому в ходе клинических испытаний исследовали появление у пациентов антител к этим примесям и влияние таких антител на эффективность терапии. У части больных отмечено образование антител, однако связь между иммунным ответом на примесные белки и эффективностью терапии не была установлена [68].

Таблица 3. Делеционные варианты FVIII

Последовательность	Название варианта	Область делеции	Источник
↓ ...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD...SQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	Natural single chain	–	[11]
...EPR-COOH (?) NH ₂ -EITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	Natural 90+80, seq.1	741?–1648	[119]
...EPR-COOH (?) NH ₂ -LQSDQEEIDYDDTI...	Natural 90+80, seq.2	741?–1654	[119, 120]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNA-----NPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	LA-VIII	760–1639	[118]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD-----DTI...	deltaII	771–1666	[121]
...EPR-----EITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	d741-1648	741–1648	[74]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...LLR---DPL...QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	90-142-80	797–1562	[122]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...LLR---DPL...QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	–	746–1562	[123]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...PPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	BDD SQ	746–1639	[119]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	N0, N8	751–1637	[124, 125]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...QAYRYRR-----QREITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	human-cl	747–1640**	[126]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...SST-----REITRTTLQSDQEEIDYDDTI...	226aa/N6	968–1647	[127]

Примечания: значком ↓ обозначены сайты процессинга FVIII, расщепление после аминокислоты, на которую указывает стрелка; * – минорный сайт процессинга природного FVIII; ** – область 1641–1647 заменена на искусственный участок.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ FVIII С ДЕЛЕЦИЕЙ В-ДОМЕНА

Циркулирующий в кровотоке природный FVIII содержит множественные формы укороченного В-домена, которые образуются при протеолизе полноразмерной двухцепочечной молекулы, и прокоагулянтные свойства таких вариантов FVIII не имеют существенных различий [118], поэтому в ряде работ были получены и охарактеризованы варианты рекомбинантного FVIII с направленной делецией области В-домена. В работе группы Кауфмана из кДНК FVIII был удален участок, кодирующий аминокислотные остатки 760–1639, т.е. практически всю область В-домена [118] (табл. 3).

Уровень прокоагулянтной активности FVIII в кондиционированной среде для клеток COS-1, трансфицированных плазмидой с кДНК делетированной формы FVIII (вариант LA-VIII), был примерно в 10 раз выше, чем в контрольной линии, трансфицированной аналогичной плазмидой, кодирующей полноразмерный FVIII. При дальнейших исследованиях было

установлено, что вариант LA-VIII полностью аналогичен природному FVIII по биохимическим свойствам, за исключением повышенной чувствительности легкой цепи LA-VIII к расщеплению тромбином [36]. В более продуктивных линиях-продуцентах FVIII делеция В-домена (вариант LA-VIII) приводила к увеличению уровня мРНК FVIII в 17 раз, но концентрация секретированного продукта возрастала только лишь на 30% [37]. Сходные данные получены для варианта FVIII deltaII, содержащего делецию 771–1666 [121], при этом уровень секреции FVIII в клетках ВНК достигал 0.6 МЕ/мл, а секретированный продукт содержал в основном одноцепочечную форму 170 кДа и две дополнительные формы тяжелой цепи 120 и 90 кДа [128]. Аналогичное преимущественное накопление одноцепочечной формы FVIII зафиксировано также при делеции участков 741–1648, 741–1668, 741–1689 [74]. Частичная делеция остатков 797–1562 в В-доме (вариант 90-142-80) также приводила к появлению полностью ак-

тивного FVIII [122], однако инъекция этого варианта кроликам вызывала появление специфических антител к линкерной области белка [129], что могло потенциально увеличить частоту образования ингибиторных антител при терапевтическом применении.

В большинстве гетерологичных систем экспрессии FVIII с делецией В-домена отмечено многократное увеличение уровня секреции продукта в сравнении с полноразмерным FVIII, такого изменения не наблюдалось в случае делеции области 741–1668, однако при замене линии CHO клеток-продуцентов на линию клеток SK-HEP-1 уровень секреции делеционного варианта FVIII был увеличен до 3.5 МЕ/млн клеток/день [130]. Интересно отметить, что раздельная экспрессия в клетках CHO генов, кодирующих укороченную тяжелую и полную легкую цепи FVIII с сигнальными пептидами тяжелой цепи, позволяет достигнуть уровня экспрессии 15 МЕ/млн клеток/день [123]. Единственным, но неустраняемым ограничением такой системы экспрессии FVIII остается загрязнение продукта непроецированной формой легкой цепи размером 90 кДа, по-видимому, содержащей С-концевой фрагмент В-домена.

Для создания рекомбинантного FVIII, не содержащего как В-домена, так и неприродного линкерного участка между тяжелой и легкой цепями, необходимо было определить такие точки начала и конца области делеции, которые позволили бы сохранить доступность доминантных сайтов процессинга природного FVIII до его «минимальной» двухцепочечной формы – R740 и R1648. Линд и соавт. [119] при систематическом переборе вариантов делеции В-домена обнаружили, что высокий уровень процессинга одноцепочечного предшественника FVIII по данным сайтам достигается при делеции остатков 746–1639 (вариант BDD SQ). При этом значимое протеолитическое расщепление цепей по другим сайтам отсутствовало. В данном варианте делеции точка соединения полипептидов тяжелой и легкой цепей FVIII попадала в середину отделяющегося линкерного пептида длиной 14 аминокислотных остатков. При N-концевом секвенировании легкой цепи секретированного FVIII BDD SQ было подтверждено преимущественное расщепление предшественника после остатков R1648 и S1657, т.е. совпадение N-концевого участка легкой цепи с природной последовательностью. Тяжелая цепь FVIII BDD SQ содержала С-концевой участок 729–740 и частичный линкерный пептид [120]. Таким образом, вариант BDD SQ позволял наиболее точно реконструировать присутствующий в кровотоке «минимальный» двухцепочечный вариант FVIII. Получены варианты лекарственной формы очищенного препарата FVIII BDD SQ – раствор с вы-

соким содержанием сахаридов [131] и безальбуминовый лиофилизат [132]. Лиофилизованная форма BDD SQ сохраняла стабильность в течение двух лет [133] и использовалась в последующих клинических испытаниях, показавших фармакологическую эффективность и безопасность препарата [134]. Вместе с тем время полураспада в кровотоке делеционной формы FVIII BDD SQ (международное непатентованное название «мороктоког альфа») было немного меньше, чем полноразмерного FVIII из донорской плазмы.

Исходный вариант промышленного процесса получения FVIII BDD SQ для медицинского применения (торговое название ReFacto®) включал в себя культивирование клеток-продуцентов на основе CHO в перфузионных биореакторах и выделение целевого белка при помощи пяти стадий хроматографии [135]. Вирусинактивацию проводили, обрабатывая промежуточный продукт детергентом и растворителем. Данные о продуктивности разработанной линии-продуцента FVIII BDD SQ отсутствуют. Продуктивность полученной независимо аналогичной линии на основе клеток CHO составила 0.5–2.0 МЕ/мл при культивировании в бессывороточной среде без индукции [136] и до 10 МЕ/мл при индукции экспрессии продукта пропионатом натрия или бутиратом натрия. При последующей модификации промышленного процесса получения FVIII BDD SQ стадию иммуноаффинной хроматографии на моноклональных антителах заменили более безопасной стадией аффинной очистки на иммобилизованном коротком пептиде [137] (торговые названия Xyntha®, ReFacto AF®) (табл. 2).

Эффективность и безопасность лекарственных препаратов FVIII BDD SQ, вполне подтвержденная в ходе клинических испытаний [138–140], впоследствии была подвергнута сомнению при мета-анализе данных множественных постмаркетинговых исследований. В работе Группо и соавт. [141] показано, что профилактическое использование FVIII BDD SQ вместо полноразмерного FVIII приводит к статистически значимому повышению риска внезапных кровотечений. Устойчивость к небольшим вариациям в исходных данных (робастность) примененного метода мета-анализа была рассмотрена в отдельной публикации и подтверждена для широкого диапазона коэффициентов пересчета числа случаев кровотечений, зафиксированных в различных исследованиях [142]. Одной из возможных причин пониженной эффективности FVIII BDD SQ при профилактическом применении могло быть неточное измерение уровня активности FVIII в плазме пациентов, вызванное использованием различных методов коагулометрии и стандартов прокоагуляционной активности FVIII [143], другой причиной, по-видимому, можно считать

уменьшенное время полураспада FVIII BDD SQ [144], вызываемое ускоренной инактивацией активированного FVIII BDD SQ активированным белком С и FXa [145].

В случае другого существенного показателя безопасности лекарственных препаратов FVIII – риска появления ингибиторов, данные для FVIII BDD SQ были несколько противоречивыми. В одних исследованиях частота возникновения ингибиторов была сходной у всех вариантов рекомбинантного FVIII [146–148], в других отмечали повышенный риск появления ингибиторов при применении FVIII BDD SQ [149]. Поскольку вероятность появления ингибиторов сильно варьирует в зависимости от типа мутации, вызвавшей гемофилию, определенных HLA-генотипов и особенностей ведения заместительной терапии, данные, полученные в разных центрах, могут сильно различаться между собой [150].

Аналогичный BDD SQ-вариант FVIII с делецией участка 751–1637 (вариант N8, табл. 3) позднее получили при экспрессии в клетках CHO [125] и использовали в клинических испытаниях, показавших биоэквивалентность N8 и препарата сравнения – полноразмерного рекомбинантного FVIII, при однократном введении в группе из 23 человек [151]. Еще одна промышленно применимая система экспрессии гена делеционного варианта FVIII получена при помощи клеток линии человека HEK293F, при этом ген FVIII содержал не прямую делецию области В-домена, а замену участка 747–1648 на «неприродный» пептид QAYRYRRQ [126] (вариант human-cl, табл. 3). Предполагалось, что присутствие в искусственном линкерном пептиде сайтов процессинга протеиназы Kex2/фурин позволит повысить уровень распада одноцепочечной формы FVIII, однако оказалось, что степень процессинга одноцепочечной формы вариантов BDD SQ и human-cl практически одинакова. По-видимому, наиболее эффективная на настоящий момент система экспрессии делеционного варианта FVIII получена при помощи специальных гибридных клеток человека НКВ11; в случае делеционного варианта FVIII 90-142-80 (табл. 3) удельная продуктивность клональных линий составила 5–10 МЕ/млн клеток/день [88, 152].

Изучение уровней экспрессии генов вариантов FVIII с делецией только С-концевых частей В-домена показало, что вариант FVIII, содержащий первые 226 аминокислот В-домена и шесть сайтов N-гликозилирования (вариант 226aa/N6), секретируется клетками линии CHO в 5 раз более эффективно, чем FVIII с делецией полного В-домена. Этот эффект можно объяснить улучшением транспорта белка-предшественника из ЭПР в аппарат Гольджи [127] (по сравнению с полноразмерной формой)

и уменьшением адсорбции секретированного FVIII на поверхность мембраны клеток-продуцентов [124] (по сравнению с обычными делеционными вариантами). Продуктивность линий-продуцентов варианта 226/N6 на основе клеток CHO достигла 11 МЕ/мл без индукции экспрессии целевого гена и 15.7 МЕ/мл при использовании среды, содержащей сыворотку [52].

ФАКТОРЫ, ОГРАНИЧИВАЮЩИЕ ПРОДУКТИВНОСТЬ СИСТЕМ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ FVIII

Сильное понижение уровня транскрипции гибридных генов, содержащих открытую рамку считывания (ОРС) FVIII, впервые описали при культивировании ретровирусных векторов [153, 154]. Присутствие ОРС FVIII не изменяло уровень инициации транскрипции, однако фрагмент ОРС размером 1.2 т.п.н. вызывал снижение эффективности элонгации транскрипции в 30–100 раз. Обнаруженный эффект зависел от ориентации, в существенной степени от положения и был делокализованным – удаление различных частей исследуемого фрагмента ОРС вызывало частичное восстановление уровня элонгации транскрипции. Позднее в другой области ОРС FVIII выявили ориентационно-независимый транскрипционный сайленсер длиной 305 п.н. [155], активность которого подавлялась бутиратом натрия [156], что позволяло увеличить уровень секреции FVIII в культуре клеток приблизительно в 6 раз. Наличие такого управляемого элемента контроля уровня транскрипции в ОРС FVIII препятствует получению эффективных терапевтических вирусных векторов, но представляет определенные преимущества при биосинтезе FVIII в культивируемых клетках. Стресс, вызываемый процессингом предшественника FVIII, может быть ограничен подавлением транскрипции гена FVIII в делящейся культуре, а последующая индукция экспрессии FVIII при добавлении бутирата натрия подвергает стрессу только плотную неделяющуюся культуру клеток.

Оптимизацию кодонов кодирующей области мРНК FVIII исследовали в работе [157]. Оказалось, что замена части кодонов на наиболее частотные для *Homo sapiens* и одновременное удаление из кодирующей области мРНК внутренних ТАТА-боксов, СН1-сайтов, сайтов связывания рибосом, криптических сайтов сплайсинга и т.п. привело к увеличению уровня FVIII:С в 7–30 раз. Одновременно с этим для делеционного варианта FVIII BDD SQ наблюдалось увеличение отношения концентрации антигена FVIII к его прокоагулянтной активности (отношение FVIII:Ag к FVIII:С) с 1.27 ± 0.3 до 2.35 ± 0.49 , что может указывать на достижение практического предела продуктивности использованной линии клеток 293

и появлению в культуральной среде нефункционального белка.

Предшественник FVIII в просвете ЭПР образует прочный комплекс с главным шапероном BiP [54], одним из основных участников сигнального пути UPR. Сверхэкспрессия гена *FVIII* индуцирует транскрипцию гена *BiP* [56], причем уровень BiP в клетке обратно пропорционален уровню секреции фактора FVIII в довольно широком диапазоне [13, 158]. Подавление экспрессии BiP при помощи коротких шпилечных РНК (shRNA) увеличивало уровень секреции FVIII человека [159] приблизительно в 2 раза при одновременном снижении числа копий мРНК *FVIII* на ~65%. Аналогичный эффект наблюдался и при сверхэкспрессии гена *XBP1*, продукт которого также участвует в UPR.

Установлено, что сверхэкспрессия гена шаперона *Hsp70* уменьшает индукцию апоптоза в плотной культуре продуцентов FVIII на основе клеток линии ВНК и увеличивает уровень секреции FVIII [160]. Аналогичные данные получены при сверхэкспрессии антиапоптотических генов *Aven* и *E1B-19K* [72]. В то же время в линии гибридных клеток человека НКВ11, продуцирующих FVIII, не наблюдали значимых изменений уровня экспрессии *Hsp70* и антиапоптотических генов *Bcl-2*, *Bcl-xL* среди клонов с различным уровнем секреции FVIII [152]. Эти данные свидетельствуют о том, что такой путь антиапоптотического реинжиниринга продуцентов FVIII может быть эффективен только для сверхплотных культур клеток ВНК.

Подавление окислительного стресса в ЭПР и вызываемых им UPR и апоптоза в клетках СНО, сверхэкспрессирующих FVIII, при помощи антиоксидантов показано в работе [51]. Введение в культуральную среду антиоксиданта бутилата гидроксанизола одновременно с бутиратом натрия – индуктором экспрессии гена *FVIII*, позволило увеличить уровень секреции полноразмерного FVIII в 4 раза. Проявления окислительного стресса зафиксированы и для варианта FVIII с полной делецией В-домена, но не варианта 226/N6.

Повышение секреции FVIII при ограничении интенсивности UPR, окислительного стресса и апоптоза клеток-продуцентов может быть связано с изменением уровня адсорбции FVIII на внешнюю мембрану клеток. В клетках СНО, секретирующих полноразмерный FVIII, концентрация FVIII в бессывороточном супернатанте возрастала в 4 раза при добавлении к культуральной среде vWF свиньи [77], т.е. не менее ¼ всего секретируемого FVIII в отсутствие vWF оставалось связанным с мембраной клеток. FVIII преимущественно связывается с фосфолипидными мембранами, содержащими фосфатидилсерин.

Для мембран активированных тромбоцитов константы диссоциации FVIII, FVIII BDD SQ и FVIIIa составляют 10.4, 5.1, 1.7 нМ соответственно [161]. Увеличение адсорбции FVIII на мембрану апоптотических клеток (также содержащую повышенную долю фосфатидилсерина) показано методом проточной цитофлуориметрии – подавление апоптоза клеток-продуцентов путем сверхэкспрессии гена *Hsp70* приводило к падению уровня адсорбции полноразмерного FVIII мембраной и увеличению его концентрации в культуральной среде [161]. В системах экспрессии вариантов гена FVIII с делецией В-домена адсорбция на мембране клеток носит более выраженный характер и может превышать 90% в случае варианта N0 (идентичен N8), при этом частичная делеция В-домена вместо полной позволяет уменьшить адсорбцию до ~50% при одновременном падении общего уровня экспрессии FVIII приблизительно вдвое [124]. Потери секретированного FVIII N0 на мембране клеток-продуцентов также могут быть уменьшены блокированием его взаимодействия с фосфатидилсеринем при добавлении к культуральной среде vWF, аннексина V или о-фосфо-L-серина [162].

ТРАНСГЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Системы экспрессии рекомбинантных белков системы гемостаза на основе культивируемых клеток потенциально возможно полностью заменить технологиями получения этих белков в молоке трансгенных животных. Примером удачной реализации такого подхода является антитромбин III, для получения которого выведены трансгенные козы с продуктивностью антитромбина III более 1 г/л, и разработаны промышленные процессы очистки целевого белка [163]. Уровень продукции FIX в молоке трансгенных свиней был значительно ниже [164], что обычно связывают с недостаточным уровнем γ -карбоксилирования продукта. Основными ограничителями продуктивности трансгенных животных, секретирующих FVIII в молоко, считаются стабильность полипептида и правильность процессинга одноцепочечной формы до гетеродимера [165]. Функционально активный полноразмерный FVIII получали в молоке мышей [166], кроликов [167], овец [168] и свиней [169], однако во всех случаях уровень секреции продукта не представлял практического интереса (табл. 4). При использовании делеционного варианта FVIII 226/N6 и коэкспрессии фактора фон Виллебранда уровень FVIII:С в молоке трансгенный мышей достиг 678 МЕ/мл, что указывает на возможность получения крупных трансгенных животных, секретирующих в молоко промышленно значимые количества FVIII, однако одновременное введение двух транскрипционно активных трансгенов в геном

Таблица 4. Основные свойства трансгенных животных, способных секретировать FVIII в молоко

Название	Объем молока, л ^{*,**}	Оценка максимальной продуктивности, г ^{*,**}	FVIII:Ag, мкг/мл	FVIII:C, МЕ/мл	Удельная активность, МЕ/мг (для плазмы 5 000 ⁺)	Продуктивность на самку в год, мг/МЕ	Примечания, источник
Мышь	0.0015	0.01–0.02	50.21	13.41	267	0.075 / 20	F1 [166]
			122–183	555–678	3705–4549	0.183–0.275 / 833–1017	Вариант 226/N6 + vWF [165]
Кролик	2–5	20	0.117***	0.521	4500***	0.234–0.585 / 1042–2605	F1 [167]
Овца	200–500	2500	н/о	0.02–0.03****	н/о	н/о / 4000–15000	F1 [168]
Свинья	200–400	1500	2.66	0.62	233	532–1064 / 124 000–248 000	F1 [169]

F1 – полноразмерный FVIII.

*В год на одну самку.

**По данным [170] и [171].

***В цитируемой работе содержание FVIII:Ag приведено в мкг/мл, что, по-видимому, является опечаткой, в таблицу данные внесены как нг/мл.

****В цитируемой работе FVIII:C измерен против стандарта природного FVIII и выражен в нг/мл, в таблицу внесены данные в МЕ/мл в предположении удельной активности стандарта 5000 МЕ/мг.

сельскохозяйственных животных потребует весьма значительных усилий.

ВАРИАНТЫ FVIII ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Несмотря на то что лекарственные препараты рекомбинантного FVIII значительно уменьшили потенциальный риск передачи вирусных инфекций, современная заместительная терапия гемофилии А остается весьма несовершенной, не обеспечивая больным нормальное качество жизни. Среди причин ограниченной эффективности заместительной терапии – иммуногенность вводимого FVIII, приводящая к появлению ингибиторных антител, и нестабильность FVIII в кровотоке, требующая проведения инъекций каждые 2–3 дня при его профилактическом применении. Поскольку риск появления ингибиторных антител к FVIII определяется, в том числе и количеством проведенных инъекций, получение производных FVIII с увеличенным временем полужизни способствовало бы решению обеих проблем.

Среди направлений изучения производных FVIII пролонгированного действия можно выделить получение конъюгатов FVIII с гидрофильными полимерами, внесение точечных мутаций, получение слитых белков и разработку гибридных вариантов FVIII человека и свиньи.

Конъюгация терапевтических белков с молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ) обычно позволяет в несколько раз увеличить время их циркуляции

в кровотоке, а в ряде случаев уменьшает иммуногенность и предохраняет от протеолитического распада. При этом ненаправленное присоединение молекул ПЭГ к терапевтическому белку может привести к его инактивации [172], а в случае FVIII блокирование его взаимодействия с vWF может привести и к сильному уменьшению времени полураспада. Исследована возможность направленного присоединения молекул ПЭГ к непарным остаткам цистеина, введенным в различные домены делеционного варианта FVIII BDD SQ сайт-направленным мутагенезом [173] (рис. 8). В случае варианта FVIII, содержащего два дополнительных остатка цистеина в положениях 129 и 1804, конъюгированных с молекулами ПЭГ 60 кДа (вариант BDD FVIII 60 kDa di-PEG-L491C/K1804C, рис. 8А), наблюдали увеличение выживаемости нокаутных мышей после рассечения хвостовой вены с 60% для интактного FVIII до 86% [173]. Ненаправленное присоединение молекул ПЭГ к полноразмерному FVIII по боковым аминокислотным группам остатков лизина также позволило получить конъюгат (код ВАХ 855, рис. 8В) со средней степенью присоединения остатков ПЭГ (2 : 1), неизменной прокоагулянтной активностью и временем жизни в кровотоке, увеличенным примерно вдвое [174].

Вследствие того, что интактный FVIII циркулирует в кровотоке в составе мультимерного высокомолекулярного комплекса с vWF, увеличение времени полураспада рекомбинантного FVIII путем создания

А		<p>BDD FVIII 60 кДа di-PEG- L491C/ K1804C Увеличение времени полувыведения при сохранении удельной активности за счет сайт-специфической модификации</p>
Б		<p>BAX-855 Увеличение времени полувыведения при сохранении удельной активности за счет преимущественной модификации остатков в В-домене</p>
В		<p>FVIII-Fc Удержание в кровотоке за счет обратимого связывания FcRn-рецептора</p>
Г		<p>IR8 FVIIIa устойчив к инактивации APC, но не связывается с vWF</p>
Д		<p>FVIII C664-C1826, C662-C1828 Стабилизация FVIIIa за счет невозможности инактивации диссоциацией A2-домена</p>
Е		<p>E1984V Стабилизация FVIIIa за счет увеличения аффинности свободного домена A2 к домену A3</p>
Ж		<p>R484A/R489A/P492A Потеря доминантного эпитопа аллоантител при сохранении функциональных свойств</p>
З		<p>HP32 Замена основных эпитопов аллоантител на гомологичные участки FVIII свиньи</p>
И		<p>FIX V181I/ K265T/ I383V Увеличение активности FIXa, достаточное для прямой активации FX</p>
К		<p>hBS23 Имитация FVIIIa биспецифическим антителом к FIXa и FX. Комплекс удерживается на мембране за счет Gla-доменов FIXa и FX</p>

Рис. 8. Варианты и функциональные аналоги FVIII пролонгированного действия. Спирали – ковалентно присоединенные группы ПЭГ, прерывистые линии – неизвестные точки конъюгации, стрелка – нековалентное взаимодействие, волнистые линии – блокирование взаимодействий. На панели 3 зеленым обозначены участки FVIII свиньи

белков, слитых с долгоживущими белками плазмы крови, например с сывороточным альбумином, представляется неперспективным. Одновременно с этим, соединение в рамке с FVIII доменов других белков, специфически защищающих их от удаления из циркуляции, может значительно увеличить стабильность FVIII. Так, белок FVIII-Fc-домен иммуноглобулинов (FVIII-Fc, *рис. 8B*) в опытах на нокаутных мышах и собаках с моделью гемофилии А вдвое дольше защищал от неконтролируемого кровотечения, чем интактный FVIII [175]. Пролонгированное действие FVIII-Fc полностью определялось взаимодействием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Клинические исследования FVIII-Fc, проведенные на 16 пациентах, показали увеличение времени нахождения FVIII-Fc в кровотоке (время от введения препарата до падения уровня FVIII:C ниже 1%) в 1.53–1.68 раза [176]. Следует отметить, что обычно профилактическое применение препаратов FVIII предполагает проведение трех инъекций в неделю, при этом для использования одной инъекции в неделю необходимо, чтобы продолжительность действия FVIII увеличилась по крайней мере в 2 раза [177]. Таким образом увеличение продолжительности действия модифицированных вариантов FVIII приблизительно в 1.5 раза по сравнению с интактным FVIII может несколько снизить риск кровотечений при существующих режимах профилактики (так называемая «проблема третьего дня»), но не перейти к более редким инъекциям.

Изменение свойств FVIII путем точечного мутагенеза описано в нескольких независимых работах, однако ни один из мутантных белков (мутеинов) не проходил клинических испытаний. Введение трех точечных замен R336I/R562K/R740A в ген делеционного варианта FVIII 741–1689 (вариант IR8, *рис. 8Г*) позволило получить белок с нормальной прокоагулянтной активностью, потерей аффинности к vWF и высокой устойчивостью к протеолитической инактивации FVIIIa активированным белком С [178], однако при применении данного варианта гена для направленной экспрессии FVIII на поверхности тромбоцитов существенных отличий в остановке кровотечений у мышей с нокаутом не отмечалось [179].

Введение пары остатков цистеина в пространственно сближенные участки доменов А2 и А3 позволяет установить дисульфидную связь между ними, стабилизировать активированный FVIII и таким образом увеличить его прокоагулянтную активность [180]. Мутеины делеционного варианта FVIII, содержащие пары цистеинов С664–С1826 или С662–С1828 (*рис. 8Д*), обладали десятикратно увеличенной удельной активностью в опытах *in vitro* по сравнению с интактным FVIII [181].

Стабильность FVIIIa также можно повысить путем замены аминокислот поверхностей интерфейсов между доменами А2, А1 и А3. Точечная замена E1984V (*рис. 8E*) привела к увеличению времени распада активированного FVIII в 4–8 раз при сохранении нормальной прокоагулянтной активности [182].

Большинство ингибиторных антител, появляющихся у больных гемофилией А, направлено к эпитопам в составе доменов А2 и С2, причем антитела к домену А2 в основном реагируют с коротким участком 484–508, поэтому замена нескольких аминокислот в этой области FVIII может снизить его иммуногенность. Тройная замена R484A/R489A/P492A (*рис. 8Ж*) оказалась достаточной для снижения среднего уровня ингибитора с 670 до 310 ед./мл у нокаутных мышей, получивших семь последовательных инъекций FVIII с интервалом 14 дней [183].

С использованием серии гибридных молекул FVIII с делетированным В-доменом 741–1648, содержащих перемежающиеся участки FVIII свиньи и человека, в опытах *in vitro* показано, что замена участка 484–508 домена А2 FVIII человека на гомологичный участок FVIII свиньи и полная замена доменов А3 и С2 человека соответствующими доменами FVIII свиньи (вариант HP32, *рис. 8З*) позволяют получить молекулу FVIII, устойчивую к ингибиторному действию большинства антител, выделенных от больных гемофилией А [184]. По этой причине проходящий клинические испытания [185] рекомбинантный FVIII свиньи с делецией В-домена (вариант OBI-1) может быть в перспективе заменен на гибридную молекулу, обладающую меньшей иммуногенностью, чем ксеногенный FVIII свиньи [186], но не несущую иммунодоминантные эпитопы FVIII человека.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНАЛОГИ FVIII

Поскольку функция FVIIIa может быть сведена к увеличению активности FIXa, высокоактивный аналог FIXa, способный генерировать достаточные количества тромбина, позволит обеспечить эффективное свертывание крови без участия FVIII. Модифицированный таким образом FIX, в отличие от FVIII, может использоваться и при ингибиторной форме гемофилии А. Введение мышам с нокаутом гена FVIII генотерапевтической плазмиды, кодирующей мутеин FIX с тройной заменой V181I, K265T, I383V, привело к улучшению показателей свертываемости крови [187], что указывает на возможность восстановления функции гемостаза при гемофилии А без использования препаратов FVIII (*рис. 8И*). Тензный комплекс также можно реконструировать, заменив молекулу FVIIIa на биспецифическое антитело, связывающее FIXa и FX. Такое антитело было отобрано методами высокопроизводительного скрининга из 40000 моле-

кул, составленных из фрагментов моноклональных антител к FIX и FX [188]. После оптимизации структуры ведущих молекул получено биспецифическое гуманизированное антитело hBS23, способное увеличивать каталитическую эффективность FIXa в 19800 раз (272000 раз для FVIII) за счет понижения K_m реакции активации FX в 20 раз и повышения k_{cat} в 1000 раз (рис. 8K). Однократная инъекция 0.3 мг/кг hBS23 макакам, служащим моделью приобретенной гемофилии А, обеспечивала практически такой же контроль кровотечения, как и терапия свинным FVIII.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основой эффективного контроля кровотечений при гемофилии А являются регулярная заместительная терапия препаратами FVIII и переход к профилактике кровотечений в педиатрической практи-

ке. Поскольку современное состояние исследований и разработок производных FVIII пролонгированного действия не позволяет рассчитывать на быстрое появление существенно усовершенствованных лекарственных препаратов, создание новых линий-продуцентов FVIII с учетом накопленных знаний о структуре FVIII и факторах, влияющих на уровень его биосинтеза и секреции, может позволить многократно увеличить объем производства. Можно предположить, что простое увеличение объема производства биосимилярных препаратов рекомбинантного FVIII «третьего поколения» позволит увеличить объем заместительной терапии при гемофилии А при сохранении текущих затрат, т.е. улучшить качество жизни больных и ее продолжительность без перераспределения в их пользу ограниченных ресурсов здравоохранения. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antonarakis S.E., Kazazian H.H., Tuddenham E.G. // Hum. Mutat. 1995. V. 5. № 1. P. 1–22.
- Kemball-Cook G. Haemophilia A Mutation Database. University College London. 1994. <http://hadb.org.uk>
- Payne A.B., Miller C.H., Kelly F.M., Michael Soucie J., Craig Hooper W. // Hum. Mutat. 2013. V. 34. № 2. P. E2382–2391.
- Blumel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Lower J., Eis-Hubinger A.M. // Transfusion. 2002. V. 42. № 11. P. 1473–1481.
- Yokozaki S., Fukuda Y., Nakano I., Katano Y., Toyoda H., Takamatsu J. // Blood. 1999. V. 94. № 10. P. 3617.
- Evatt B.L. // Haemophilia. 1998. V. 4. № 4. P. 628–633.
- Brooks A.R., Harkins R.N., Wang P., Qian H.S., Liu P., Rubanyi G.M. // J. Gene Med. 2004. V. 6. № 4. P. 395–404.
- Kim M., O'Callaghan P.M., Droms K.A., James D.C. // Biotechnol. Bioengin. 2011. V. 108. № 10. P. 2434–2446.
- Sabatino D.E., Nichols T.C., Merricks E., Bellinger D.A., Herzog R.W., Monahan P.E. // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2012. V. 105. P. 151–209.
- Gitschier J., Wood W.I., Goralka T.M., Wion K.L., Chen E.Y., Eaton D.H., Vehar G.A., Capon D.J., Lawn R.M. // Nature. 1984. V. 312. № 5992. P. 326–330.
- Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Sultzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Shoemaker C., Orr E.C., et al. // Nature. 1984. V. 312. № 5992. P. 342–347.
- Cho M.S., Tran V.M. // Virology. 1993. V. 194. № 2. P. 838–842.
- Dunne M.J., Kane C., Shepherd R.M., Sanchez J.A., James R.F., Johnson P.R., Aynsley-Green A., Lu S., Clement J.P., et al. // N. Engl. J. Med. 1997. V. 336. № 10. P. 703–706.
- Stel H.V., van der Kwast T.H., Veerman E.C. // Nature. 1983. V. 303. № 5917. P. 530–532.
- Do H., Healey J.F., Waller E.K., Lollar P. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 28. P. 19587–19592.
- Hollestelle M.J., Thinnis T., Crain K., Stiko A., Kruijt J.K., van Berkel T.J., Loskutoff D.J., van Mourik J.A. // Thromb. Haemost. 2001. V. 86. № 3. P. 855–861.
- Vehar G.A., Keyt B., Eaton D., Rodriguez H., O'Brien D.P., Rotblat F., Oppermann H., Keck R., Wood W.I., Harkins R.N., et al. // Nature. 1984. V. 312. № 5992. P. 337–342.
- Wood W.I., Capon D.J., Simonsen C.C., Eaton D.L., Gitschier J., Keyt B., Seeburg P.H., Smith D.H., Hollingshead P., Wion K.L., et al. // Nature. 1984. V. 312. № 5992. P. 330–337.
- Kjalke M., Heding A., Talbo G., Persson E., Thomsen J., Ezban M. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 234. № 3. P. 773–779.
- Donath M.J., Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 240. № 2. P. 365–372.
- Colman R.W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 1578 p.
- Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. // Blood. 1998. V. 92. № 11. P. 3983–3996.
- Andrew P.J., Auer M., Lindley I.J., Kauffmann H.F., Kungl A.J. // FEBS Lett. 1997. V. 408. № 3. P. 319–323.
- Pemberton S., Lindley P., Zaitsev V., Card G., Tuddenham E.G., Kemball-Cook G. // Blood. 1997. V. 89. № 7. P. 2413–2421.
- McCune J.S., Liles D., Lindley C. // Pharmacotherapy. 1997. V. 17. № 4. P. 822–826.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Coccain-Bousquet M. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 17. P. 5282–5287.
- Harvey M.J., Cauvin A., Dale M., Lindley S., Ballabio R. // J. Small Anim. Pract. 1997. V. 38. № 8. P. 336–339.
- Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P., Paganetti P. // Science. 2003. V. 299. № 5611. P. 1397–1400.
- Liu M. L., Shen B.W., Nakaya S., Pratt K.P., Fujikawa K., Davie E.W., Stoddard B.L., Thompson A.R. // Blood. 2000. V. 96. № 3. P. 979–987.
- Larocca D., Peterson J.A., Urrea R., Kuniyoshi J., Bistrain A.M., Ceriani R.L. // Cancer Res. 1991. V. 51. № 18. P. 4994–4998.
- Lin L., Huai Q., Huang M., Furie B., Furie B.C. // J. Mol. Biol. 2007. V. 371. № 3. P. 717–724.
- Johnson J.D., Edman J.C., Rutter W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 12. P. 5677–5681.
- Stubbs J.D., Lekutis C., Singer K. L., Bui A., Yuzuki D., Srinivasan U., Parry G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 21. P. 8417–8421.
- Shima M., Scandella D., Yoshioka A., Nakai H., Tanaka I., Kamisue S., Terada S., Fukui H. // Thromb. Haemost. 1993. V. 69. № 3. P. 240–246.
- Elder B., Lakich D., Gitschier J. // Genomics. 1993. V. 16. № 2. P. 374–379.

36. Pittman D.D., Alderman E.M., Tomkinson K.N., Wang J.H., Giles A.R., Kaufman R.J. // *Blood*. 1993. V. 81. № 11. P. 2925–2935.
37. Pittman D.D., Marquette K.A., Kaufman R.J. // *Blood*. 1994. V. 84. № 12. P. 4214–4225.
38. Cho M.S., Yee H., Brown C., Jeang K.T., Chan S. // *Cytotechnology*. 2001. V. 37. № 1. P. 23–30.
39. Wakabayashi H., Koszelak M.E., Matri M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 34. P. 10293–10300.
40. Tagliavacca L., Moon N., Dunham W.R., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 43. P. 27428–27434.
41. Ngo J.C., Huang M., Roth D.A., Furie B.C., Furie B. // *Structure*. 2008. V. 16. № 4. P. 597–606.
42. Shen B.W., Spiegel P.C., Chang C.H., Huh J.W., Lee J.S., Kim J., Kim Y.H., Stoddard B.L. // *Blood*. 2008. V. 111. № 3. P. 1240–1247.
43. Fay P.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1988. V. 262. № 2. P. 525–531.
44. Wise R.J., Dorner A.J., Krane M., Pittman D.D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 32. P. 21948–21955.
45. Wakabayashi H., Schmidt K.M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 26. P. 8485–8492.
46. Wakabayashi H., Zhen Z., Schmidt K.M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 1. P. 145–153.
47. Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Lindley P.F., Fox P.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 21. P. 11546–11551.
48. Wakabayashi H., Freas J., Zhou Q., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 13. P. 12677–12684.
49. Kaufman R.J., Wasley L.C., Dorner A.J. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 13. P. 6352–6362.
50. Pipe S.W., Morris J.A., Shah J., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 14. P. 8537–8544.
51. Malhotra J.D., Miao H., Zhang K., Wolfson A., Pennathur S., Pipe S.W., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 47. P. 18525–18530.
52. Selvaraj S.R., Scheller A.N., Miao H.Z., Kaufman R.J., Pipe S.W. // *J. Thromb. Haemost.* 2012. V. 10. № 1. P. 107–115.
53. Hagiwara M., Nagata K. // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. V. 16. № 10. P. 1119–1128.
54. Liles D., Landen C.N., Monroe D.M., Lindley C.M., Read M.S., Roberts H.R., Brinkhous K.M. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. № 5. P. 944–948.
55. Malhi H., Kaufman R.J. // *J. Hepatol.* 2011. V. 54. № 4. P. 795–809.
56. Dorner A.J., Wasley L.C., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 34. P. 20602–20607.
57. Brown H.C., Gangadharan B., Doering C.B. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 27. P. 24451–24457.
58. Murphy M.E., Lindley P.F., Adman E.T. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 4. P. 761–770.
59. Swaroop M., Moussalli M., Pipe S.W., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24121–24124.
60. Tagliavacca L., Wang Q., Kaufman R.J. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 8. P. 1973–1981.
61. Moussalli M., Pipe S.W., Hauri H.P., Nichols W.C., Ginsburg D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 46. P. 32539–32542.
62. Zakas P.M., Gangadharan B., Almeida-Porada G., Porada C.D., Spencer H.T., Doering C.B. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. P. e49481.
63. Nogami K., Wakabayashi H., Schmidt K., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 3. P. 1634–1641.
64. Zhang B., McGee B., Yamaoka J.S., Guglielmo H., Downes K.A., Minoldo S., Jarchum G., Peyvandi F., de Bosch N.B., Ruiz-Saez A., et al. // *Blood*. 2006. V. 107. № 5. P. 1903–1907.
65. Fay P.J., Smudzin T.M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 19. P. 13246–13250.
66. White G.C., 2nd, McMillan C.W., Kingdon H.S., Shoemaker C.B. // *N. Engl. J. Med.* 1989. V. 320. № 3. P. 166–170.
67. Lee D.C., Miller J.L., Petteway S.R., Jr. // *Haemophilia*. 2002. V. 8. Suppl 2. P. 6–9.
68. Yoshioka A. // *Textbook of Hemophilia*. New York: Wiley-Blackwell, 2010. P. 146–152.
69. Zhang B., Kaufman R.J., Ginsburg D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 27. P. 25881–25886.
70. Jankowski M.A., Patel H., Rouse J.C., Marzilli L.A., Weston S.B., Sharpe P.J. // *Haemophilia*. 2007. V. 13. № 1. P. 30–37.
71. Regan L.M., O'Brien L.M., Beattie T.L., Sudhakar K., Walker F.J., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 8. P. 3982–3987.
72. Nivitchanyong T., Martinez A., Ishaque A., Murphy J.E., Konstantinov K., Betenbaugh M.J., Thrift J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 98. № 4. P. 825–841.
73. Nogami K., Wakabayashi H., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 19. P. 16502–16509.
74. Leyte A., van Schijndel H.B., Niehrs C., Huttner W.B., Verbeet M.P., Mertens K., van Mourik J.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 2. P. 740–746.
75. Higuchi M., Wong C., Kochhan L., Olek K., Aronis S., Kasper C.K., Kazazian H.H., Jr., Antonarakis S.E. // *Genomics*. 1990. V. 6. № 1. P. 65–71.
76. Michnick D.A., Pittman D.D., Wise R.J., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 31. P. 20095–20102.
77. Adamson R. // *Ann. Hematol.* 1994. V. 68. Suppl 3. P. S9–14.
78. Leyte A., Verbeet M.P., Brodniewicz-Proba T., van Mourik J.A., Mertens K. // *Biochem. J.* 1989. V. 257. № 3. P. 679–683.
79. Saenko E.L., Scandella D. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 29. P. 18007–18014.
80. Jacquemin M., Benhida A., Peerlinck K., Desqueper B., Vander Elst L., Lavend'homme R., d'Oiron R., Schwaab R., Bakkus M., Thielemans K., et al. // *Blood*. 2000. V. 95. № 1. P. 156–163.
81. Hamer R.J., Koedam J.A., Beeser-Visser N.H., Sixma J.J. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 167. № 2. P. 253–259.
82. Hill-Eubanks D.C., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 29. P. 17854–17858.
83. Koedam J.A., Hamer R.J., Beeser-Visser N.H., Bouma B.N., Sixma J.J. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 189. № 2. P. 229–234.
84. Koedam J.A., Meijers J.C., Sixma J.J., Bouma B.N. // *J. Clin. Invest.* 1988. V. 82. № 4. P. 1236–1243.
85. Fay P.J., Coumans J.V., Walker F.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 4. P. 2172–2177.
86. Nogami K., Shima M., Nishiya K., Hosokawa K., Saenko E.L., Sakurai Y., Shibata M., Suzuki H., Tanaka I., Yoshioka A. // *Blood*. 2002. V. 99. № 11. P. 3993–3998.
87. Nesheim M., Pittman D.D., Giles A.R., Fass D.N., Wang J.H., Slonosky D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 27. P. 17815–17820.
88. Cho M.S., Yee H., Brown C., Mei B., Mirenda C., Chan S. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. № 1. P. 229–232.
89. Gilbert G.E., Drinkwater D., Barter S., Clouse S.B. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 22. P. 15861–15868.
90. Gilles J.G., Jacquemin M.G., Saint-Remy J.M. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 78. № 1. P. 641–646.
91. Franchini M., Lippi G. // *Blood*. 2008. V. 112. № 2. P. 250–255.
92. Tuddenham E.G., McVey J.H. // *Haemophilia*. 1998. V. 4. № 4. P. 543–545.
93. Gouw S.C., van den Berg H.M., Oldenburg J., Astermark J., de Groot P.G., Margaglione M., Thompson A.R., van Heerde W., Boekhorst J., Miller C.H., le Cessie S., van der Bom J.G. // *Blood*. 2012. V. 119. № 12. P. 2922–2934.

94. Towfighi F, Gharagozlou S, Sharifian R.A., Kazemnejad A., Esmailzadeh K, Managhchi M.R., Shokri F. // *Acta Haematol.* 2005. V. 114. № 2. P. 84–90.
95. Green D. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 6. P. 831–838.
96. Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebeke J., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 9. P. 1044–1047.
97. Lacroix-Desmazes S, Bayry J., Misra N., Horn M.P., Villard S., Pashov A., Stieltjes N., d'Oiron R., Saint-Remy J.M., Hoebeke J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 346. № 9. P. 662–667.
98. Lenting P.J., Donath M.J., van Mourik J.A., Mertens K. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 10. P. 7150–7155.
99. Duffy E.J., Parker E.T., Mutucumarana V.P., Johnson A.E., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 24. P. 17006–17011.
100. Curtis J.E., Helgerson S.L., Parker E.T., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 8. P. 6246–6251.
101. Bovenschen N., Boertjes R.C., van Stempvoort G., Voorberg J., Lenting P.J., Meijer A.B., Mertens K. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 11. P. 9370–9377.
102. Gilbert G.E., Furie B.C., Furie B. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 2. P. 815–822.
103. Kamball-Cook G., Barrowcliffe T.W. // *Thromb. Res.* 1992. V. 67. № 1. P. 57–71.
104. Cho M.S., Chan S.Y. Vectors having terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus: Patent of USA № 6180108. 2001 (<http://www.google.com/patents/US6180108>).
105. Saenko E.L., Scandella D., Yakhyaev A.V., Greco N.J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 43. P. 27918–27926.
106. Arai M., Scandella D., Hoyer L.W. // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. № 6. P. 1978–1984.
107. Eaton D., Rodriguez H., Vehar G.A. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 2. P. 505–512.
108. Lollar P., Knutson G.J., Fass D.N. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 27. P. 8056–8064.
109. Fay P.J., Haidaris P.J., Smudzin T.M. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 14. P. 8957–8962.
110. Hockin M.F., Jones K.C., Everse S.J., Mann K.G. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 21. P. 18322–18333.
111. Saenko E.L., Yakhyaev A.V., Mikhailenko I., Strickland D.K., Sarafanov A.G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 53. P. 37685–37692.
112. Lenting P.J., Neels J.G., van den Berg B.M., Clijsters P.P., Meijerman D.W., Pannekoek H., van Mourik J.A., Mertens K., van Zonneveld A.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 34. P. 23734–23739.
113. Turecek P.L., Schwarz H.P., Binder B.R. // *Blood.* 2000. V. 95. № 11. P. 3637–3638.
114. Sarafanov A.G., Ananyeva N.M., Shima M., Saenko E.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 15. P. 11970–11979.
115. Schwartz R.S., Abildgaard C.F., Aledort L.M., Arkin S., Bloom A.L., Brackmann H.H., Brettler D.B., Fukui H., Hilgartner M.W., Inwood M.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1990. V. 323. № 26. P. 1800–1805.
116. Josephson C.D., Abshire T. // *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2004. V. 2. № 7. P. 441–446.
117. Gomperts E., Lundblad R., Adamson R. // *Transfus. Med. Rev.* 1992. V. 6. № 4. P. 247–251.
118. Toole J.J., Pittman D.D., Orr E.C., Murtha P., Wasley L.C., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 16. P. 5939–5942.
119. Lind P., Larsson K., Spira J., Sydow-Backman M., Almstedt A., Gray E., Sandberg H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 232. № 1. P. 19–27.
120. Sandberg H., Almstedt A., Brandt J., Gray E., Holmquist L., Oswaldsson U., Sebring S., Mikaelsson M. // *Thromb. Haemost.* 2001. V. 85. № 1. P. 93–100.
121. Meulien P., Faure T., Mischler F., Harrer H., Ulrich P., Bouderbala B., Dott K., Sainte Marie M., Mazurier C., Wiesel M. L., et al. // *Protein Eng.* 1988. V. 2. № 4. P. 301–306.
122. Eaton D.L., Wood W.I., Eaton D., Hass P.E., Hollingshead P., Wion K., Mather J., Lawn R.M., Vehar G.A., Gorman C. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 26. P. 8343–8347.
123. Yonemura H., Sugawara K., Nakashima K., Nakahara Y., Hamamoto T., Mimaki I., Yokomizo K., Tajima Y., Masuda K., Imaizumi A., et al. // *Protein Eng.* 1993. V. 6. № 6. P. 669–674.
124. Kolind M.P., Norby P.L., Flintegaard T.V., Berchtold M.W., Johnsen L.B. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 147. № 3–4. P. 198–204.
125. Thim L., Vandahl B., Karlsson J., Klausen N.K., Pedersen J., Krogh T.N., Kjalke M., Petersen J.M., Johnsen L.B., Bolt G., Norby P.L., Steenstrup T.D. // *Haemophilia.* 2010. V. 16. № 2. P. 349–359.
126. Sandberg H., Kannicht C., Stenlund P., Dadaian M., Oswaldsson U., Cordula C., Walter O. // *Thromb. Res.* 2012. V. 130. № 5. P. 808–817.
127. Miao H.Z., Sirachainan N., Palmer L., Kucab P., Cunningham M.A., Kaufman R.J., Pipe S.W. // *Blood.* 2004. V. 103. № 9. P. 3412–3419.
128. Krishnan S., Kolbe H.V., Lepage P., Faure T., Sauerwald R., de la Salle H., Muller C., Bihoreau N., Paolantonacci P., Roitsch C., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 195. № 3. P. 637–644.
129. Esmo P.C., Kuo H.S., Fournel M.A. // *Blood.* 1990. V. 76. № 8. P. 1593–1600.
130. Herlitschka S.E., Schlokot U., Falkner F.G., Dorner F. // *J. Biotechnol.* 1998. V. 61. № 3. P. 165–173.
131. Fatouros A., Osterberg T., Mikaelsson M. // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. № 12. P. 1679–1684.
132. Osterberg T., Fatouros A., Mikaelsson M. // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. № 7. P. 892–898.
133. Osterberg T., Fatouros A., Neidhardt E., Warne N., Mikaelsson M. // *Semin. Hematol.* 2001. V. 38. № 2. Suppl 4. P. 40–43.
134. Fijnvandraat K., Berntorp E., ten Cate J.W., Johnsson H., Peters M., Savidge G., Tengborn L., Spira J., Stahl C. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. № 2. P. 298–302.
135. Eriksson R.K., Fenge C., Lindner-Olsson E., Ljungqvist C., Rosenquist J., Smeds A.L., Ostlin A., Charlebois T., Leonard M., Kelley B.D., Ljungqvist A. // *Semin. Hematol.* 2001. V. 38. № 2. Suppl 4. P. 24–31.
136. Chun B.H., Park S.Y., Chung N., Bang W.G. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. № 4. P. 315–319.
137. Kelley B.D., Tannatt M., Magnusson R., Hagelberg S., Booth J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 87. № 3. P. 400–412.
138. Lusher J.M., Lee C.A., Kessler C.M., Bedrosian C.L. // *Haemophilia.* 2003. V. 9. № 1. P. 38–49.
139. Smith M.P., Giangrande P., Pollman H., Littlewood R., Kollmer C., Feingold J. // *Haemophilia.* 2005. V. 11. № 5. P. 444–451.
140. Recht M., Nemes L., Matysiak M., Manco-Johnson M., Lusher J., Smith M., Mannucci P., Hay C., Abshire T., O'Brien A., Hayward B., Udata C., Roth D.A., Arkin S. // *Haemophilia.* 2009. V. 15. № 4. P. 869–880.
141. Gruppo R.A., Brown D., Wilkes M.M., Navickis R.J. // *Haemophilia.* 2004. V. 10. № 6. P. 747–750.
142. Gruppo R.A., Brown D., Wilkes M.M., Navickis R.J. // *Haemophilia.* 2004. V. 10. № 5. P. 449–451.
143. Morfini M., Cinotti S., Bellatreccia A., Paladino E., Gringeri A., Mannucci P.M. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. № 11. P. 2283–2289.

144. Johnston A. // *Ther. Drug Monit.* 2012. V. 34. № 1. P. 110–117.
145. Khrenov A.V., Ananyeva N.M., Saenko E.L. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2006. V. 17. № 5. P. 379–388.
146. Lusher J.M. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2002. V. 28. № 3. P. 273–276.
147. Pollmann H., Externest D., Ganser A., Eifrig B., Kreuz W., Lenk H., Pabinger I., Schramm W., Schwarz T.F., Zimmermann R., et al. // *Haemophilia.* 2007. V. 13. № 2. P. 131–143.
148. Gouw S.C., van den Berg H.M., le Cessie S., van der Bom J.G. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 7. P. 1383–1390.
149. Aledort L.M., Navickis R.J., Wilkes M.M. // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 11. P. 2180–2192.
150. Lee C.A., Kessler C.M., Varon D., Martinowitz U., Heim M., Vermynen J. // *Haemophilia.* 1998. V. 4. № 4. P. 538–542.
151. Martinowitz U., Bjerre J., Brand B., Klamroth R., Misgav M., Morfini M., Santagostino E., Tiede A., Viuff D. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 6. P. 854–859.
152. Mei B., Chen Y., Chen J., Pan C.Q., Murphy J.E. // *Mol. Biotechnol.* 2006. V. 34. № 2. P. 165–178.
153. Lynch C.M., Israel D.I., Kaufman R.J., Miller A.D. // *Hum. Gene Ther.* 1993. V. 4. № 3. P. 259–272.
154. Koeberl D.D., Halbert C.L., Krumm A., Miller A.D. // *Hum. Gene Ther.* 1995. V. 6. № 4. P. 469–479.
155. Hoeben R.C., Fallaux F.J., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., van Ormondt H., Briet E., van der Eb A.J. // *Blood.* 1995. V. 85. № 9. P. 2447–2454.
156. Fallaux F.J., Hoeben R.C., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., Briet E., van Ormondt H., van Der Eb A.J. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 8. P. 4264–4272.
157. Ward N.J., Buckley S.M., Waddington S.N., Vandendriessche T., Chuah M.K., Nathwani A.C., McIntosh J., Tuddenham E.G., Kinnon C., Thrasher A.J., et al. // *Blood.* 2011. V. 117. № 3. P. 798–807.
158. Roe S.M., Gormal C., Smith B.E., Baker P., Rice D., Card G., Lindley P. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1997. V. 53. Pt 2. P. 227–228.
159. Lindley E.J. // *EDTNA ERCA J.* 1997. V. 23. № 2. P. 50–51.
160. Ishaque A., Thrift J., Murphy J.E., Konstantinov K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 97. № 1. P. 144–155.
161. Li X., Gabriel D.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 35. P. 10760–10767.
162. Kolind M.P., Norby P.L., Berchtold M.W., Johnsen L.B. // *J. Biotechnol.* 2011. V. 151. № 4. P. 357–362.
163. Levy J.H., Weisinger A., Ziomek C.A., Echelard Y. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2001. V. 27. № 4. P. 405–416.
164. Gil G.C., Velander W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology.* 2008. V. 18. № 7. P. 526–539.
165. Pipe S.W., Miao H., Butler S.P., Calcaterra J., Velander W.H. // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 11. P. 2235–2242.
166. Chen C.M., Wang C.H., Wu S.C., Lin C.C., Lin S.H., Cheng W.T. // *Transgenic Res.* 2002. V. 11. № 3. P. 257–268.
167. Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A.V., Uhrin P., Paleyanda R.K., Binder B.R. // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. № 3. P. 353–361.
168. Niemann H., Halter R., Carnwath J. W., Herrmann D., Lemme E., Paul D. // *Transgenic Res.* 1999. V. 8. № 3. P. 237–247.
169. Paleyanda R.K., Velander W.H., Lee T.K., Scandella D.H., Gwazdauskas F.C., Knight J.W., Hoyer L.W., Drohan W.N., Lubon H. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 10. P. 971–975.
170. Dove A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10. P. 1045–1048.
171. Panno J. *Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer.* New York: Facts on File, 2004. 176 p.
172. Rostin J., Smeds A.L., Akerblom E. // *Bioconjug. Chem.* 2000. V. 11. № 3. P. 387–396.
173. Mei B., Pan C., Jiang H., Tjandra H., Strauss J., Chen Y., Liu T., Zhang X., Severs J., Newgren J., Chen J., Gu J.M., Subramanyam B., Fournel M.A., Pierce G.F., Murphy J.E. // *Blood.* 2010. V. 116. № 2. P. 270–279.
174. Turecek P.L., Bossard M.J., Graninger M., Gritsch H., Hollriegel W., Kaliwoda M., Matthiessen P., Mitterer A., Muchitsch E.M., Purtscher M., et al. // *Hamostaseologie.* 2012. V. 32. Suppl 1. P. S29–38.
175. Dumont J.A., Liu T., Low S.C., Zhang X., Kamphaus G., Sakorafas P., Fraley C., Drager D., Reidy T., McCue J., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 13. P. 3024–3030.
176. Powell J.S., Josephson N.C., Quon D., Ragni M.V., Cheng G., Li E., Jiang H., Li L., Dumont J.A., Goyal J., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 13. P. 3031–3037.
177. Pipe S.W. // *Blood.* 2010. V. 116. № 2. P. 153–154.
178. Pipe S.W., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 22. P. 11851–11856.
179. Greene T.K., Wang C., Hirsch J.D., Zhai L., Gewirtz J., Thornton M.A., Miao H. Z., Pipe S.W., Kaufman R.J., Camire R.M., et al. // *Blood.* 2010. V. 116. № 26. P. 6114–6122.
180. Gale A.J., Pellequer J.L. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. № 9. P. 1966–1971.
181. Radtke K.P., Griffin J.H., Riceberg J., Gale A.J. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 1. P. 102–108.
182. Wakabayashi H., Varfaj F., Deangelis J., Fay P.J. // *Blood.* 2008. V. 112. № 7. P. 2761–2769.
183. Parker E.T., Healey J.F., Barrow R.T., Craddock H.N., Lollar P. // *Blood.* 2004. V. 104. № 3. P. 704–710.
184. Barrow R.T., Healey J.F., Gailani D., Scandella D., Lollar P. // *Blood.* 2000. V. 95. № 2. P. 564–568.
185. Toschi V. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010. V. 12. № 5. P. 617–625.
186. Kempton C.L., Abshire T.C., Deveras R.A., Hoots W.K., Gill J.C., Kessler C.M., Key N.S., Konkle B.A., Kuriakose P., Macfarlane D.E., et al. // *Haemophilia.* 2012. V. 18. № 5. P. 798–804.
187. Milanov P., Ivanciu L., Abriss D., Quade-Lyssy P., Miesbach W., Alesci S., Tonn T., Grez M., Seifried E., Schuttrumpf J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 2. P. 602–611.
188. Kitazawa T., Igawa T., Sampei Z., Muto A., Kojima T., Soeda T., Yoshihashi K., Okuyama-Nishida Y., Saito H., Tsunoda H., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 10. P. 1570–1574.

УДК 599:576.316.74:576.315.42

Эволюционный путь процесса инактивации X-хромосомы у млекопитающих

А. И. Шевченко^{1,2,3}, И. С. Захарова^{1,2,3}, С. М. Закиан^{1,2,3*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздравсоцразвития РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

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

Поступила в редакцию 02.11.2012

РЕФЕРАТ Инактивация X-хромосомы – сложный эпигенетический процесс, который существует у сумчатых и плацентарных млекопитающих. Предполагают, что возникновение этого процесса связано с дифференцировкой половых хромосом и необходимостью компенсации дозы генов X-хромосомы у самцов и самок. В обзоре рассмотрены особенности процесса инактивации X-хромосомы у сумчатых и плацентарных, а также обсуждаются гипотезы о его происхождении и эволюции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА млекопитающие, инактивация X-хромосомы, *Xist*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ХИС – центр инактивации X-хромосомы; PAR – псевдоаутосомный район X-хромосомы млекопитающих.

ВВЕДЕНИЕ

Класс Mammalia (млекопитающие) разделяется на два подкласса: Prototheria (первозвери, яйцекладущие, или однопроходные) и Theria (звери). В подклассе Theria, в свою очередь, выделяют инфраклассы Metatheria (сумчатые) и Eutheria (плацентарные). Дивергенция однопроходных и сумчатых произошла 166.2 млн лет назад, дивергенция сумчатых и плацентарных – 147.7 млн лет назад [1].

Онтогенез самок сумчатых и плацентарных млекопитающих сопровождается уникальным эпигенетическим феноменом – гетерохроматизацией одной из двух X-хромосом и инактивацией ее транскрипции, которые поддерживаются в поколениях клеток [2, 3]. Предполагают, что этот механизм произошел из-за необходимости компенсировать дозы генов гетероморфных половых хромосом у особей разного пола. У представителей Theria пол детерминируется парой гетероморфных половых хромосом – X и Y. Мужской пол определяется сочетанием половых хромосом XY, а женский – XX. Поскольку Y-хромосома содержит лишь несколько десятков генов, а X-хромосома – около тысячи генов, большинство генов X-хромосомы представлены одной копией у самцов (XY) и двумя копиями у самок (XX). Инактивация одной X-хромосомы у самок приводит

к тому, что у особей обоих полов транскрипционно активна только одна копия генов X-хромосомы, и соответственно в клетках синтезируется приблизительно равное количество продуктов X-сцепленных генов. Инактивация X-хромосомы осуществляется за счет специфических ядерных РНК и репрессирующих транскрипцию модификаций хроматина, которые отличаются у сумчатых и плацентарных млекопитающих [3, 4]. В данном обзоре рассмотрена эволюция процесса инактивации X-хромосомы.

ФЕНОМЕНОЛОГИЯ ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Однопроходные используют для дозовой компенсации процесс, отличающийся от инактивации X-хромосомы

Нынеживущих представителей самого древнего среди млекопитающих подкласса первозвери (Prototheria) – один вид утконосов и четыре вида ехидн – объединяют в отряд однопроходные (Monotremata). В отличие от остальных млекопитающих, однопроходные имеют сложную систему определения пола. Самцы утконоса *Ornithorhynchus anatinus* имеют пять X- и пять Y-хромосом, у самцов ехидны *Tachyglossus aculeatus* обнаружено пять X- и четыре Y-хромосомы

Таблица 1. Соотношение уровня экспрессии генов X-хромосом в клетках у самок и самцов утконоса, а также частота их моноаллельной экспрессии [10]

Хромосома	Ген	Соотношение уровня экспрессии у самок и самцов	Доля ядер с моноаллельной экспрессией
Полная компенсация			
X ₁	<i>Ox_plat_124086</i>	1.10	46
X ₅	<i>ZNF474</i>	1.01	53
X ₅	<i>LOX</i>	1.06	53
X ₃	<i>APC</i>	1.17	48
X ₅	<i>SHB</i>	1.23	53
Частичная компенсация			
X ₅	<i>FBXO10</i>	1.37	50
X ₅	<i>EN14997</i>	1.40	61
Компенсация отсутствует			
X ₅	<i>SEMA6A</i>	1.82	74
X ₅	<i>DMRT2</i>	2.04	47
X ₅	<i>SLC1A1</i>	2.78	45

[5–7]. Гены, свойственные X-хромосомам сумчатых и плацентарных млекопитающих, у однопроходных располагаются на аутосомах [7–9]. Однако на X-хромосомах однопроходных обнаружены гены, характерные для половой хромосомы Z птиц, включая ген *Dmrt1*, который у птиц, предположительно, играет основную роль в определении пола. Наиболее протяженный участок, гомологичный Z-хромосоме курицы, обнаружен у утконоса на хромосоме X₅, менее протяженные области гомологии располагаются на хромосомах X₁, X₂ и X₃ (рис. 1).

На всех X- и Y-хромосомах однопроходных имеются гомологичные псевдоаутосомные районы, благодаря которым X- и Y-хромосомы конъюгируют друг с другом в мейозе [5–7]. Однако протяженные районы хромосом X₁–X₅ утконоса, на долю которых приходится суммарно около 12% генома, не гомологичны и не имеют сходства с Y₁–Y₅. Можно ожидать, что существует механизм дозовой компенсации генов, локализующихся в этих районах. Количественный анализ транскрипции генов, расположенных в дифференцированных районах разных X-хромосом утконоса [10], показал, что часть из них имеют одинаковый уровень транскрипции в клетках самок и самцов, экспрессия остальных генов либо компенсируется лишь частич-

но, либо не компенсируется вообще, т.е. оказывается в 2 раза выше в клетках самок по сравнению с клетками самцов (табл. 1). Таким образом, вероятно, дозовая компенсация у однопроходных действует лишь в отношении отдельных генов половых хромосом, напоминая неполную и переменную дозовую компенсацию, наблюдающуюся у птиц [11, 12]. С частотой от 50 до 70% в ядрах клеток самок утконоса транскрипция генов, обнаруживающих дозовую компенсацию, выявляется только на одной из гомологичных X-хромосом. Тем не менее в суммарной мРНК в равном количестве присутствуют транскрипты, соответствующие каждому из гомологов. Эти данные позволяют предположить, что дозовая компенсация у однопроходных осуществляется за счет снижения уровня транскрипции одного из аллелей, выбор которого в каждой клетке происходит случайным образом [10]. Поскольку на цитологическом уровне у самок утконоса каждая пара X-хромосом не имеет видимых различий в модификациях хроматина, предполагают, что дозовая компенсация у однопроходных затрагивает отдельные гены, а не хромосомы в целом [13].

Псевдоаутосомная часть хромосомы X₁ ехидны характеризуется в некоторых типах клеток поздней репликацией [14], которую можно рассматри-

Таблица 2. Статус экспрессии генов X-хромосом у разных видов сумчатых [8]

Ген	Вид	Метод	Инактивация в соматических тканях
<i>G6pd</i>	<i>Macropus robustus</i>	Изоферментный анализ, SNUPE	Полная
	<i>Macropus rufogriseus</i>	Изоферментный анализ	Полная
	<i>Didelphis virginiana</i>	Изоферментный анализ	Неполная
<i>Gla</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	ОТ-ПЦР	Полная
	<i>Antechinus stuartii</i>	Изоферментный анализ	Полная
<i>Pgk1</i>	<i>Kangaroo hybrids</i>	«	Полная
	<i>Macropus giganteus</i>	«	Тканеспецифичная
	<i>Macropus parryi</i>	«	«
	<i>Trichosurus vulpecula</i>	«	«
	<i>Didelphis virginiana</i>	«	«
	<i>Monodelphis domestica</i>	SNUPE	Неполная

вать как признак неактивного хроматина, хотя гены, локализуемые в данном районе, присутствуют как на X_1 , так и на Y_1 и не нуждаются в дозовой компенсации. Ранее этот район, учитывая его предрасположенность к инактивации, рассматривали в качестве предковой области, в которой предположительно мог сформироваться механизм сайленсинга целой хромосомы. Однако, поскольку содержащиеся в данном районе гены у сумчатых и плацентарных млекопитающих располагаются на аутосомах и не задействованы в инактивации, от этого предположения отказались.

Таким образом, очевидно, что однопроходные, в отличие от сумчатых и плацентарных млекопитающих, используют для дозовой компенсации механизм, который отличается от процесса инактивации X-хромосомы.

Инактивация X-хромосомы у сумчатых – импринтированная, неполная и тканеспецифичная

Инфракласс сумчатые (Metatheria) включает 270 видов, 200 из которых обитают в Австралии, 69 – в Южной Америке и 1 – в Северной Америке. Эволюционное разделение австралийских и американских сумчатых произошло 70 млн лет назад [9, 15]. Половые хромосомы сумчатых и плацентарных млекопитающих имеют общее происхождение. X-хромосома сумчатых представляет собой 2/3 X-хромосомы плацентарных млекопитающих, оставшаяся треть генов локализуется на аутосоме (рис. 1). Сумчатые – наиболее древние млекопитающие, у самок которых до-

зовая компенсация происходит за счет инактивации X-хромосомы, однако процесс инактивации у сумчатых и плацентарных млекопитающих имеет ряд существенных отличий.

Для всех тканей сумчатых характерна неслучайная импринтированная инактивация, при которой наблюдается подавление транскрипции генов и устанавливается поздняя репликация в S-фазе клеточного цикла исключительно на X-хромосоме, унаследованной от отца [16, 17]. Вероятно, за процесс инактивации в масштабах хромосомы отвечает специфическая для сумчатых нетранслируемая ядерная РНК *Rsx* (RNA-on-the-silent X), которая способна распространяться по неактивной X-хромосоме и репрессировать транскрипцию генов [4]. Изучена импринтированная инактивация трех генов X-хромосомы в тканях у восьми видов (табл. 2). Обнаружено, что неактивное состояние X-хромосомы отцовского происхождения нестабильно, и зачастую происходит реактивация генов. Оказалось, что инактивация у сумчатых затрагивает не все гены в равной мере, т.е. является неполной. Кроме того, в зависимости от ткани одни и те же локусы X-хромосомы могут быть инактивированы в разной степени. Например, у североамериканского вирджинского опоссума *Didelphis virginiana* ген фосфолипидкиназы A (*Pgk1*) полностью инактивирован во всех тканях, тогда как в большинстве тканей не наблюдается стабильной репрессии отцовского аллеля гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*G6pd*) [18]. У южноамериканского серого короткохвостого опоссума *Monodelphis domestica*, в отличие

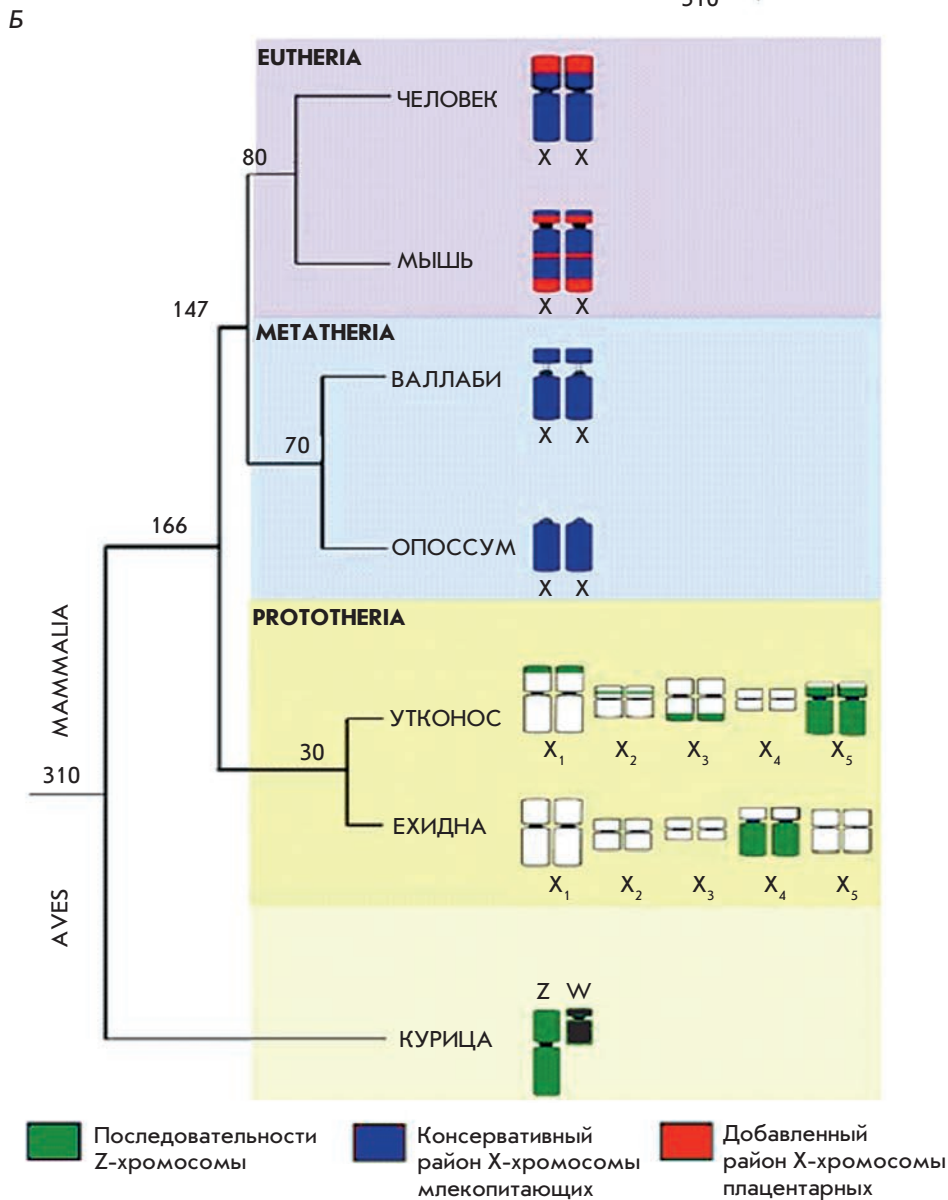
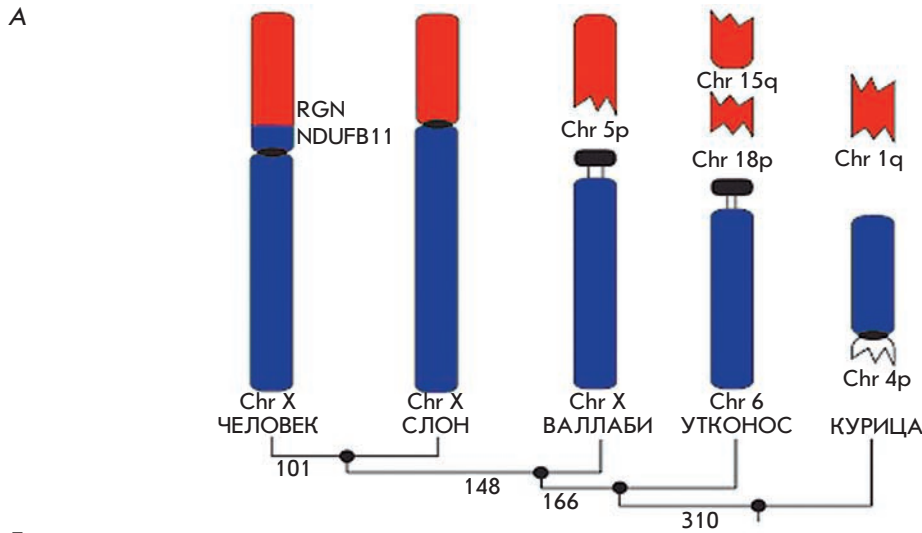


Рис. 1. Происхождение и эволюция X-хромосомы млекопитающих. **А** – У птиц (курица) и однопроходных (утконос, ехидна) гены X-хромосомы млекопитающих локализованы на аутосомах. У сумчатых (валлаби, опоссум) X-хромосома представляет собой наиболее древнюю часть X-хромосомы млекопитающих (отображена синим цветом) и содержит 2/3 генов, представленных на X-хромосоме плацентарных. X-хромосома плацентарных млекопитающих содержит добавленный участок (отображен красным цветом), который у сумчатых локализуется на аутосоме [7]. **Б** – У однопроходных выявлено пять X-хромосом, которые не имеют ничего общего с X-хромосомой плацентарных, однако содержат последовательности, гомологичные Z-хромосоме птиц [9]. В основании ветвей филогенетических деревьев указано время дивергенции таксонов в миллионах лет назад

от вирджинского опоссума, напротив, отцовский аллель *Gbpd* стабильно инактивирован, тогда как *Pgk1* демонстрирует во всех тканях неполную инактивацию [19]. Таким образом, ортологичные гены у разных видов сумчатых могут инактивироваться в разной степени.

Следует отметить, что инактивация X-хромосомы – не единственный механизм дозовой компенсации у сумчатых. У представителей семейства бандикутов (сумчатые барсуки, *Paramelidae*) на разных стадиях онтогенеза в соматических клетках элиминируются Y-хромосома у самцов и одна из двух X-хромосом у самок [20]. Элиминация половых хромосом в разных тканях может наблюдаться как во всех клетках, так и в части из них. Исследование экспрессии аллелей X-сцепленного гена *Pgk1* у южного бандикута *Isoodon obesulus* показывает, что у самок утрачивается исключительно X-хромосома, унаследованная от отца [21]. В тех клетках, где элиминация половых хромосом не произошла, X-хромосома отцовского происхождения у самок и Y-хромосома у самцов являются поздно-реплицирующимися. Механизм утраты половых хромосом неизвестен, однако преимущественная потеря X-хромосомы отцовского происхождения и асинхронная репликация X-хромосом у самок указывают на то, что у сумчатых этот процесс возник, вероятно, как направление в эволюции процесса инактивации X-хромосомы.

Плацентарные млекопитающие имеют импринтированную и случайную инактивацию X-хромосомы, которые контролируются центром инактивации и геном *Xist*

Инфракласс плацентарных (*Eutheria*), подразделяющийся на четыре надотряда *Afrotheria*, *Xenarthra*, *Euarchontoglires* и *Laurasiatheria*, является самым многочисленным, разнообразным и распространенным среди млекопитающих. X-хромосома плацентарных млекопитающих на 2/3 состоит из генов, составляющих X-хромосому сумчатых, а также содержит добавленный участок, который у сумчатых локализуется на аутоosome [9] (рис. 1). В отличие от сумчатых, у самок плацентарных в клетках взрослых особей X-хромосомы отцовского и материнского происхождения инактивированы с равной вероятностью, таким образом, в среднем половина клеток экспрессирует гены отцовской X-хромосомы, а другая половина – материнской. Случайная инактивация, в отличие от импринтированной, охватывает большинство генов X-хромосомы и стабильно поддерживается в ряду клеточных поколений. Следует заметить, что гены добавленного района X-хромосомы плацентарных млекопитающих, которые у сумчатых

локализовались на аутоosome и не были вовлечены в процесс инактивации, инактивируются менее эффективно и способны избегать инактивации [22]. Процесс случайной инактивации у плацентарных включает несколько стадий: подсчет числа X-хромосом на диплоидный геном, выбор X-хромосомы для инактивации, инициацию инактивации, распространение неактивного состояния и его поддержание в ряду клеточных поколений [3, 23]. Вероятно, стадия выбора X-хромосом, на которой происходит взаимоисключающий выбор будущей активной и неактивной X-хромосом, как у мыши, характерна не для всех видов плацентарных. Например, в раннем развитии кролика инактивация происходит стохастически, в результате образуются разные клетки, в которых ни одна из двух X-хромосом не инактивирована, инактивированы обе X-хромосомы, случайным образом инактивирована одна из двух X-хромосом. Впоследствии из-за нарушений дозы генов первые два типа клеток погибают, а оставшиеся с нормальной инактивацией формируют органы и ткани организма [24].

В некоторых таксонах плацентарных млекопитающих, например у грызунов и парнокопытных, наряду со случайной имеется также импринтированная, неполная и нестабильная инактивация X-хромосомы, унаследованной от отца, которая, однако, происходит только на предимплантационных стадиях развития эмбриона и сохраняется в клетках, из которых формируются внезародышевые органы – плацента и желточный мешок [25, 26].

Как случайная, так и импринтированная инактивация у плацентарных контролируются центром инактивации (XIC) и геном *Xist*, которые не обнаружены у однопроходных и сумчатых [3, 23]. Во время случайной инактивации ген *Xist* обеспечивает инициацию инактивации и распространение неактивного состояния, тогда как другие элементы центра инактивации работают на стадии подсчета X-хромосом и выбора хромосомы для инактивации.

Становление полной и стабильной инактивации сопровождалось заменой некодирующей РНК *Rsx* на *Xist* и появлением на неактивной X-хромосоме *Xist*-зависимых модификаций гистонов совместно с метилированием ДНК в промоторах

Несмотря на отличия, инактивация X-хромосомы у сумчатых и плацентарных млекопитающих имеет много общих черт, которые, вероятно, отражают фундаментальные и наиболее древние механизмы, заложенные в этот процесс (рис. 2) [13, 27, 28]. Как у сумчатых, так и у плацентарных млекопитающих неактивная X-хромосома выявляется в интерфазных ядрах самок в виде цитологически разли-

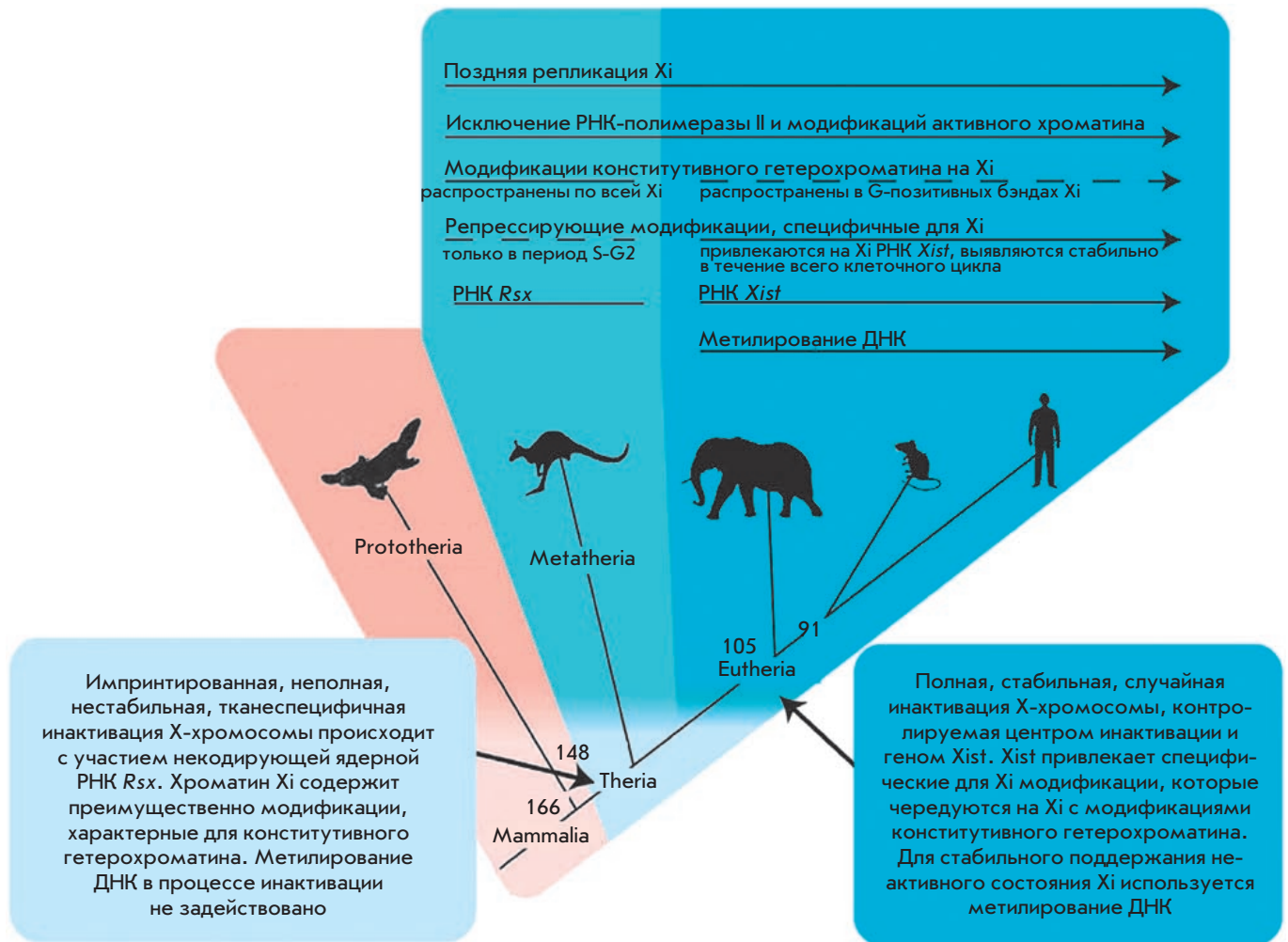


Рис. 2. Эволюция эпигенетических механизмов процесса инактивации X-хромосомы у млекопитающих [28]. Xi – неактивная X-хромосома. В основании ветвей филогенетического дерева указано время дивергенции таксонов в миллионах лет назад

чимой глыбки компактного хроматина, называемой тельцем Барра. Из хромосомной территории неактивной X-хромосомы в интерфазных ядрах практически полностью исключена отвечающая за транскрипцию генов ДНК-зависимая РНК-полимераза II. Неактивная X-хромосома является поздне-реплицирующейся, на время репликации она перемещается в околоядрышковую область ядра, обогащенную ферментами, необходимыми для воспроизведения структуры неактивного хроматина. На неактивной X-хромосоме исключены ковалентные модификации гистонов, характерные для транскрипционно активного хроматина, и присутствуют модификации, свойственные транскрипционно неактивному хроматину. Хроматин неактивной X-хромосомы со-

держит нетранслируемую ядерную РНК, которая экспрессируется только с неактивной X-хромосомы и распространяется по ней, вызывая инактивацию генов.

Следует особо подчеркнуть, что сумчатые и плацентарные млекопитающие используют в процессе инактивации совершенно разные, неродственные по происхождению, некодирующие ядерные РНК Rsx и Xist, которые обладают сходными свойствами и поведением в процессе инактивации [4]. Обе некодирующие РНК обогащены микросателлитными повторами, которые, как показано для РНК гена Xist, являются важными функциональными доменами, необходимы для репрессии транскрипции, распространения по неактивной X-хромосоме и связывания бел-

ковых комплексов, ответственных за модификацию хроматина [29] (рис. 3). Важную роль в инактивации транскрипции генов X-хромосомы играют эволюционно консервативные мини-сателлитные A-повторы, расположенные в первом экзоне гена *Xist* [30]. Делеция A-повторов приводит к тому, что РНК *Xist* не способна вызывать инактивацию транскрипции X-сцепленных генов, хотя нормально распространяется по X-хромосоме [29, 31]. За распространение РНК *Xist* по X-хромосоме отвечает кумулятивное действие микросателлитных повторов B, C, D, E [32]. Район мини-сателлитных C-повторов отвечает за связывание РНК *Xist* с хроматином неактивной X-хромосомы посредством белка hnRNP U (известного также как SP120 и SAF-A (scaffold attachment factor A)) [31, 33–35]. hnRNP U (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U) – белок, имеющий три консервативных домена: SAF-Box, который связывается с АТ-богатым районом ДНК, известным как S/MAR (scaffold- or matrix-attachment region), домен SPRY (Spla and Ryanodine receptor) с неизвестной функцией и РНК-связывающий домен RGG (arginine-glycine-glycine). Наличие этих доменов обуславливает взаимодействие hnRNP U с ДНК и с РНК *Xist*, что способствует ее удержанию у инактивируемой X-хромосомы [35].

Следует также отметить, что неактивная X-хромосома сумчатых на протяжении всего клеточного цикла стабильно ассоциирована с гетерохроматиновым белком HP1, гистоном H3, триметилированным по лизину K9, и гистоном H4, триметилированным по лизину K20, которые характерны для районов центромерного и теломерного конститутивного гетерохроматина [13, 28, 36]. Некоторые из модификаций, специфичных для неактивной



Рис. 3. Функциональные домены РНК гена *Xist*. А, В, С, D, E, F – мини-сателлитные повторы, входящие в РНК *Xist*. (+++) – последовательности, ответственные за распространение РНК гена *Xist* по X-хромосоме. Стрелки показывают районы А- и Е-повторов, участвующие в связывании комплекса белков PRC2, и район С-повторов, отвечающий за связывание РНК *Xist* с неактивной X-хромосомой посредством белка hnRNP U (SP120/SAF-A). А-повторы РНК гена *Xist* необходимы также для установления транскрипционного сайленсинга генов и формирования хромосомной территории неактивной X-хромосомы [3]

X-хромосомы плацентарных (например, триметилированный гистон H3 по лизину 27), могут появляться на неактивной X-хромосоме сумчатых временно в период с S- до ранней G2-фазы клеточного цикла.

У плацентарных, подобно сумчатым, на ранних стадиях импринтированной инактивации репрессия всей X-хромосомы может осуществляться исключительно за счет модификаций, свойственных районам конститутивного гетерохроматина [37]. На более поздних стадиях импринтированной инактивации, а также при случайной инактивации эти модификации представлены на неактивной X-хромосоме только в районах, обогащенных повторенными последовательностями, которые соответствуют G-позитивным бэндам. Обогащенные генами области неактивной X-хромосомы стабильно в течение всего клеточного цикла репрессированы с помощью триметилирования H3 по лизину K27, моноубиквитинирования H2A по лизину K119, а также включения в состав хроматина гистона макроH2A1.2, которые солокализуются с РНК гена *Xist* [38–42]. Появление модификаций, солокализующихся с геном *Xist*, зависит от его экспрессии, репрессия *Xist* и нарушения в распространении его РНК ведут к утрате данных модификаций на неактивной X-хромосоме [29, 31, 43]. Более того, обнаружено, что в РНК гена *Xist* имеются два сайта, способных связываться с комплексом белков PRC2 (Polycomb repressive complex 2), выполняющих функцию гистонметилтрансфераз, отвечающих за триметилирование H3K27 [44].

Еще одно эпигенетическое отличие в процессе инактивации у сумчатых и плацентарных млекопитающих – метилирование ДНК неактивной X-хромосомы. У плацентарных млекопитающих в процессе случайной инактивации в тканях эмбриона ДНК неактивной X-хромосомы, в отличие от активной, гиперметируется по CpG-динуклеотидам, расположенным в промоторах и 5'-нетранслируемых областях генов [45]. Подобное метилирование не является при нестабильной импринтированной инактивации в экстраэмбриональных тканях плацентарных и в соматических тканях сумчатых [18, 19, 46]. Вероятно, метилирование промоторной ДНК во время случайной инактивации возникло у плацентарных как дополнительная стадия стабилизации неактивного состояния X-хромосомы в соматических клетках.

ГИПОТЕЗЫ О ПРОИСХОЖДЕНИИ И ЭВОЛЮЦИИ ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ

Импринтированная инактивация, по-видимому, более древняя

Считают, что исходной и наиболее примитивной, вероятно, является импринтированная инактивация

X-хромосомы, которая происходит во всех тканях и органах сумчатых и во внезародышевых органах (плацента, желточный мешок) у ряда плацентарных. В дальнейшем импринтированная инактивация эволюционировала в более предпочтительный процесс случайной инактивации, интегрировав в себя контролируемые центром инактивации механизмы подсчета числа X-хромосом на диплоидный набор и выбора будущей неактивной X-хромосомы.

Импринтированная инактивация в отдельных таксонах у плацентарных могла сохраняться или возникать заново, интегрировав в себя новые механизмы, предлагаемые центром инактивации и геном *Xist*. Так, по крайней мере у мыши импринтированная инактивация происходит с участием ХИС и *Xist*, при этом в ХИС обнаружен импринтинг, предотвращающий экспрессию *Xist* и защищающий от инактивации X-хромосому, унаследованную от матери [23]. Однако в других таксонах, например у человека, импринтированная инактивация полностью утрачена [47].

Процесс инактивации мог произойти от механизмов импринтированной или случайной моноаллельной экспрессии аутосомных генов, а также от мейотического сайленсинга половых хромосом

В настоящее время нет удовлетворительных объяснений того, как произошел процесс инактивации X-хромосомы. Механизм инактивации мог возникнуть на X-хромосоме *de novo* или быть заимствован от уже существовавшего процесса сайленсинга.

Предполагают, что основой для импринтированной инактивации X-хромосомы мог стать механизм, который используется для импринтированной моноаллельной экспрессии генов на одной из двух гомологичных аутосом [48]. Импринтинг экспрессии генов на аутосомах широко распространен и консервативен у сумчатых и плацентарных млекопитающих. У плацентарных млекопитающих как при импринтинге генов на аутосомах, так и при инактивации X-хромосомы задействованы ядерные РНК, экспрессия которых вызывает транскрипционное «молчание» генов *in cis*, утрату модификаций, характерных для активного хроматина, и привлечение модификаций, свойственных неактивному хроматину. У плацентарных оба эти процесса происходят на ранних стадиях эмбрионального развития, сохраняются в плаценте и утрачиваются в собственно эмбрионе.

Следует отметить, что моноаллельная экспрессия аутосомных генов, устанавливающаяся случайным образом, – феномен тоже достаточно распространенный. Так, гены иммуноглобулинов, обонятельных рецепторов, T-клеточных рецепторов, рецепторов нор-

мальных киллерных клеток служат примером генов с моноаллельной экспрессией, которая устанавливается стохастически. Многие гены со случайной моноаллельной экспрессией характеризуются асинхронной репликацией: в S-фазе клеточного цикла аллели на одном гомологе реплицируются рано, на другом – поздно. Похоже, что асинхронная репликация этих генов устанавливается в раннем развитии. Кластеры разных генов с моноаллельной экспрессией, локализуемые на одной хромосоме на большом расстоянии друг от друга, в пределах одного гомолога имеют одинаковое время репликации [49]. Это позволяет предположить, что у каждого гомолога из пары существует, вероятно, собственная специфическим образом организованная хромосомная территория, подобная области неактивной X-хромосомы, которая выявляется цитологически в интерфазных ядрах сумчатых и плацентарных в виде глыбы компактного хроматина, названной тельцем Барра [23]. Таким образом, не исключено, что инактивация X-хромосомы произошла от механизма стохастической моноаллельной экспрессии генов, в который затем мог быть привнесен импринтинг [50].

Предполагают также, что импринтированная инактивация X-хромосомы, унаследованная от отца, произошла от процесса мейотической инактивации половых хромосом в сперматогенезе либо является его продолжением [18]. В ходе сперматогенеза в результате мейотической инактивации половых хромосом на стадии пахитены мейоза половые хромосомы подвергаются транскрипционному сайленсингу и образуют половое, или XY-тельце. В пользу предположения о том, что импринтированная инактивация X-хромосомы может быть связана с процессом мейотической инактивации половых хромосом в сперматогенезе свидетельствуют, например, данные о том, что при импринтированной инактивации у сумчатых и на ранних стадиях импринтированной инактивации у плацентарных используются такие же модификации хроматина, как и при мейотической инактивации [37]. Предполагаемое родство мейотической и импринтированной инактивации дает основание думать, что на начальных этапах эволюции процесс инактивации X-хромосомы мог осуществляться без участия ядерной РНК, некодирующей белок, а если подобная РНК существовала, то не играла ключевой роли в репрессии транскрипции. Почву для подобного предположения дают сведения о том, что сходные модификации, обеспечивающие репрессию хроматина, при мейотической и импринтированной инактивации не специфичны для неактивной X-хромосомы, а характерны для всех областей конститутивного гетерохроматина в геноме, и их появление, по крайней мере на X-хромосоме плацентарных, не зависит

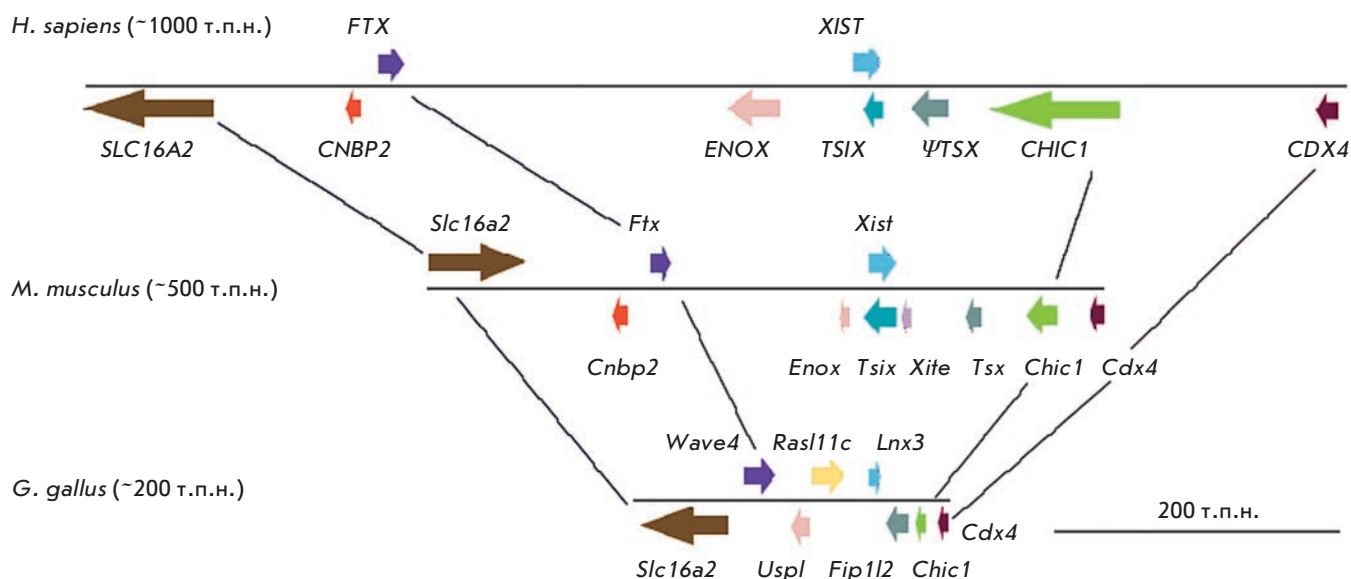


Рис. 4. Сравнение центра инактивации X-хромосомы человека (*Homo sapiens*) и мыши (*Mus musculus*) с гомологичным районом на хромосоме 4 курицы (*Gallus gallus*). Цветными стрелками показано расположение генов и направление их транскрипции. Стрелки гомологичных генов окрашены в одинаковый цвет. *Cdx4*, *Chic1* и *Slc16a2* – консервативные белоккодирующие гены, фланкирующие как XIC на X-хромосоме плацентарных, так и гомологичный ему район на хромосоме 4 курицы. *Cnbp2* – белоккодирующий ген, встроившийся в локус XIC плацентарных в результате ретропозиции. *Tsx* – белоккодирующий ген, специфически экспрессирующийся в семенниках, который частично произошел из гена *Fip112*. У человека ген *TSX* не функционален и представляет собой псевдоген. Гены XIC: *Xist*, *Enox* (*Jpx*) и *Ftx* – кодируют протяженные нетранслируемые ядерные РНК; они обнаруживают гомологию с родственными белоккодирующими генами курицы *Lnх3*, *Uspl* и *Wave4* соответственно. Дивергировавшие остатки белоккодирующего гена *Rasl11c* обнаружены у плацентарных между генами *Ftx* и *Enox*. Размеры локусов приведены в скобках в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.)

от экспрессии *Xist*. Более того, мейотическая инактивация и начальные стадии импринтированной инактивации у плацентарных могут успешно осуществляться в отсутствие РНК *Xist* [51, 52]. У сумчатых мейотическая репрессия генов в сперматогенезе также не зависит от гена *Rsx*, который на данной стадии не экспрессируется [4]. Таким образом, можно предположить, что изначально роль ядерной РНК в процессе инактивации X-хромосомы могла заключаться в организации специфической хромосомной территории или перемещении неактивной хромосомы в околядрышковый компартмент для обеспечения ее репликации, которые происходят с непосредственным участием РНК гена *Xist* [53–55]. Лишь впоследствии ядерные РНК стали использоваться непосредственно для репрессии транскрипции и привлечения белковых комплексов, репрессирующих хроматин. Следует, однако, помнить, что коровые гистоны вместе с эпигенетическими сведениями о транскрипционном статусе хроматина при упаковке хромосом в спермии в большинстве случаев замещаются на прота-

мины, а метилирование CpG-островков ДНК, используемое для наследования неактивного статуса, у X-сцепленных генов не обнаружено [19]. Таким образом, не вполне ясно, как неактивное состояние хроматина после мейотической инактивации может передаваться в зиготу. Кроме того, поскольку молекулярные механизмы как мейотической, так и импринтированной инактивации не известны, трудно судить, насколько в действительности родственны эти процессы.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ЦЕНТРА ИНАКТИВАЦИИ И ГЕНА *Xist*

Гены центра инактивации произошли из белоккодирующих генов и мобильных элементов

У плацентарных млекопитающих процесс инактивации управляется сложным генетическим локусом X-хромосомы – центром инактивации (XIC). У эволюционно далеких видов плацентарных в составе

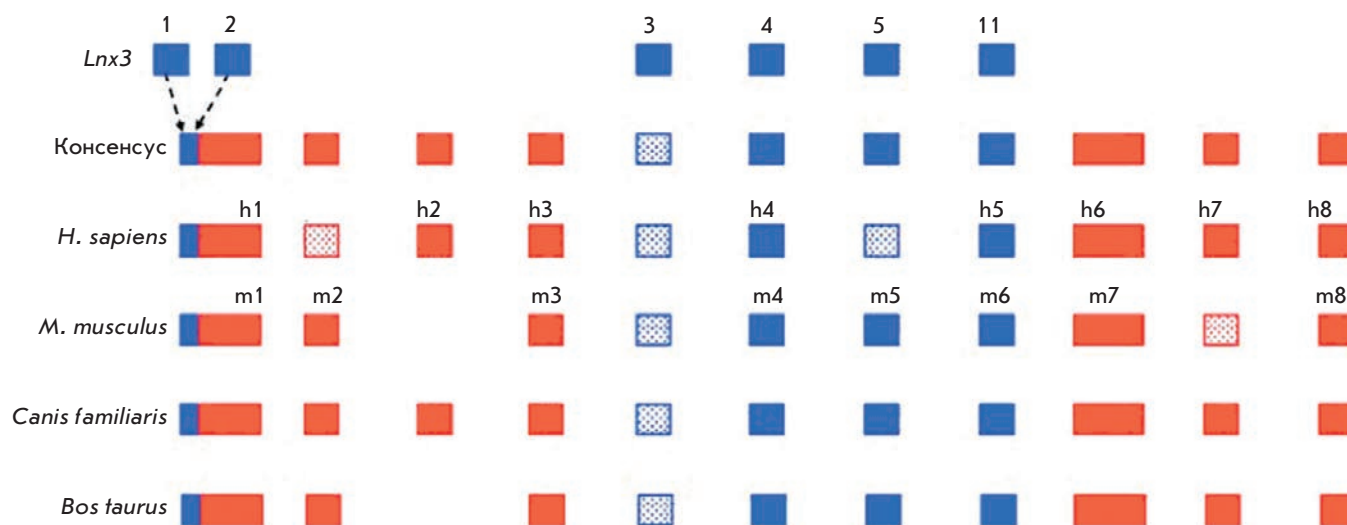


Рис. 5. Происхождение гена *Xist* из последовательностей белкокодирующего гена *Lnx3* и мобильных элементов разных классов [61]. Синие прямоугольники – экзоны, эволюционировавшие из гена *Lnx3*; красные прямоугольники – экзоны, произошедшие из мобильных элементов. Заштрихованные синие и красные прямоугольники – последовательности экзонов, выявляющиеся в геноме, но не входящие в состав транскрипта *Xist* у данного вида. Консенсус – предположительная предковая структура гена *Xist*. Для генов *Xist* человека (*Homo sapiens*) и мыши (*Mus musculus*) приведена нумерация экзонов (m1–m8 – экзоны *Xist* мыши, h1–h8 – экзоны *Xist* человека)

ХИС, кроме *Xist*, выявляются еще два гена, кодирующих ядерные РНК, *Enox* (*Jpx*) и *Ftx*, которые, как показано в экспериментах на мышах, являются активаторами экспрессии *Xist* [56–59]. Также ХИС содержит белкокодирующие гены *Tsx* и *Cnbp2*, продукты которых не участвуют в инактивации [56]. Показано, что на хромосоме 4 курицы несколько белкокодирующих генов в районе синтении с ХИС имеют гомологию с генами центра инактивации и, вероятно, были их предшественниками [60]. Основой для образования *Xist* послужил ген *Lnx3*, белковый продукт которого содержит убиквитин-лигазный домен PDZ (рис. 4). Сравнение этих генов показало, что промоторная область и, по крайней мере, три экзона гена *Xist* произошли из последовательностей гена *Lnx3*. Самый большой первый экзон гена *Xist*, вероятно, произошел из эндогенных ретровирусов, фрагменты которых после инсерции в локус амплифицировались и сформировали простые тандемные повторы нескольких типов, выявленные в его составе. Остальные экзоны гена *Xist* имеют сходство с мобильными элементами разных классов (рис. 5) [61]. Белкокодирующие гены, окружающие ген *Lnx3*, дали начало другим генетическим элементам центра инактивации млекопитающих (рис. 4). Из гена *Fip112* произошел ген *Tsx*. Два других гена – *Uspl* и *Wave4* – стали основой для формирования *Enox* (*Jpx*) и *Ftx* соответственно. Можно отметить, что в составе гена *Enox*

(*Jpx*), как и в *Xist*, обнаружены экзоны, образованные из мобильных элементов, которые у разных видов соответствуют различным типам повторов [56, 57, 61].

У однопроходных и сумчатых ген *Xist* отсутствует, и район, гомологичный центру инактивации плацентарных, разделен на части хромосомными перестройками

У однопроходных и сумчатых в результате скрининга геномных библиотек и тщательного поиска гомологии в секвенированных геномах не обнаружено прямого ортолога гена *Xist* или других последовательностей ХИС [62]. Более того, у них выявлены белкокодирующие гены-предшественники ХИС, разделенные независимыми хромосомными перестройками и локализующиеся в виде двух отдельных групп – у сумчатых на X-хромосоме и у однопроходных на хромосоме 6 [60, 62–64]. РНК гена *Lnx3* у сумчатых имеет нативную рамку считывания, экспрессируется как у самцов, так и у самок, и, очевидно, функционирует как белкокодирующий ген, а не как нетранслируемая ядерная РНК, подобная *Xist*. Таким образом, белкокодирующие гены-предшественники ХИС преобразовались в гены центра инактивации только у плацентарных млекопитающих, процесс инактивации у сумчатых происходит без участия *Xist* и ХИС. Ген *Rsx* у сумчатых, выполняющий, вероятно, функции, сходные с геном *Xist* плацентарных, примыкает к бе-

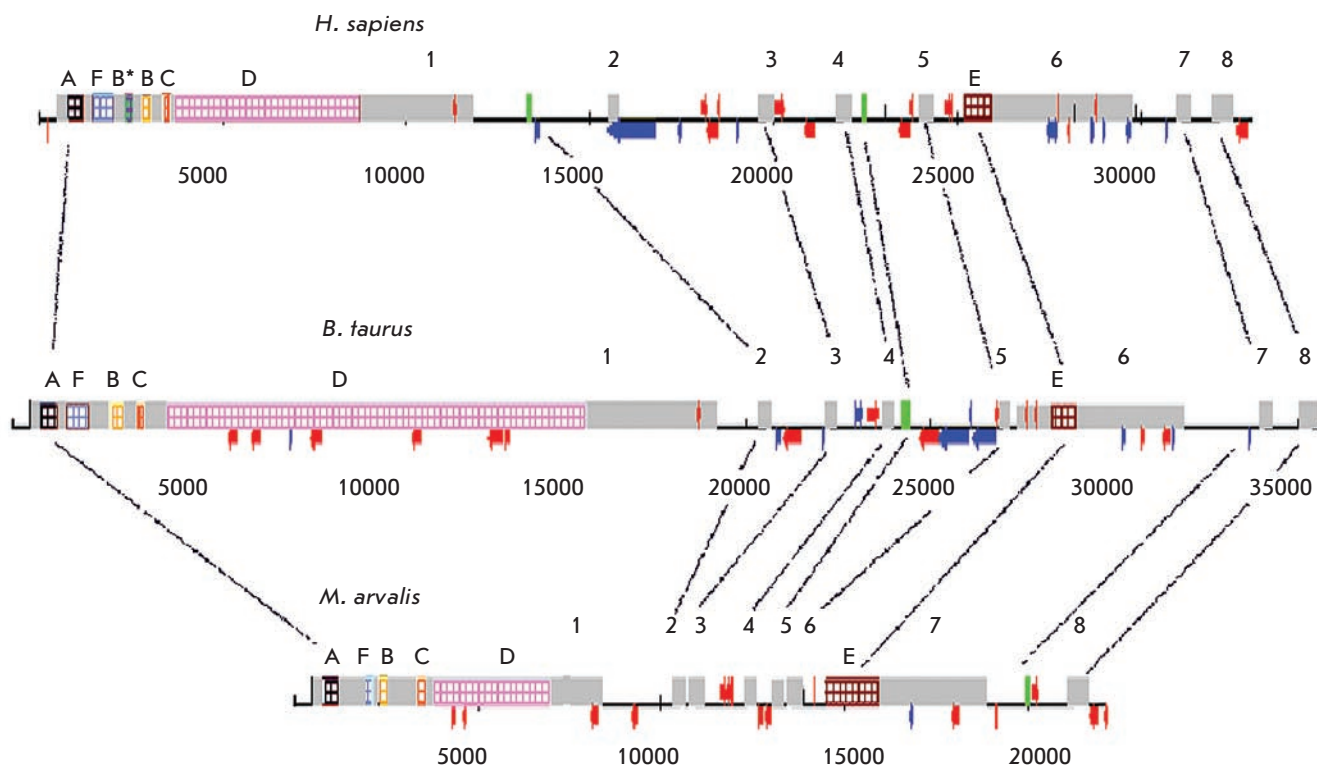


Рис. 6. Вариабельность экзон-интронной структуры и размеров гена *Xist* у человека (*Homo sapiens*), коровы (*Bos taurus*) и полевки (*Microtus arvalis*). Серые прямоугольники – экзоны (1–8). Зеленые прямоугольники – фрагменты интронов *Xist*, которые являются экзонами у других видов. Гомологичные элементы *Xist* у разных видов соединены линиями. Цветные прямоугольники внутри экзонов *Xist* – тандемные микросателлитные повторы А, В, В*, С, D, E и F. Эволюционно молодые видоспецифические мобильные элементы LINE и SINE указаны синими и красными стрелками соответственно. Размеры локусов даны в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.)

локкодирующему гену X-хромосомы *Hprt* и не имеет общего происхождения с *Xist* и XIC [4].

Ген *Xist* и центр инактивации в процессе эволюции быстро накапливают видоспецифические различия

Ген *Xist* выявлен в геномах у представителей всех четырех надотрядов млекопитающих, включая наиболее древних Afrotheria и Xenarthra [62]. Однако ген *Xist* не консервативен и эволюционирует очень быстро [56, 60, 61, 65]. Экзоны гена *Xist* изменяются медленнее, чем интроны. Самый консервативный экзон 4 демонстрирует наибольшее сходство с экзоном гена *Lnx3*. Парадоксально, что выполняющий определенные функции первый экзон, и, в частности, район А-повтора, необходимый для установления транскрипционного «молчания» генов, изменяются в эволюции быстрее, чем экзон 4, делеция которого не влияет на инактивацию. У разных видов плацентарных число экзонов в гене варьирует от шести до восьми (рис. 6). Последовательности, являющие-

ся экзонами у одних видов, могут входить в состав интронов у других. Размер некоторых экзонов может изменяться за счет образования новых экзон-интронных границ. Размер самого большого первого экзона гена *Xist* изменяется за счет амплификации и делеций входящих в его состав тандемных повторов и инсерций/делеций таксоноспецифических мобильных элементов. В результате этой вариабельности длина РНК *Xist* у представителей разных отрядов может различаться приблизительно в 2 раза. Считают, что различия гена *Xist* по размеру РНК, наличию экзонов, повторов и мобильных элементов связаны с его адаптацией к функционированию в геноме и X-хромосоме каждого конкретного вида.

В XIC мыши имеются еще два гена, кодирующих ядерную РНК – *Tsix*, экспрессирующийся с антисмысловой цепи гена *Xist*, и *Xite* (X-inactivation intergenic transcriptional element). Эти гены регулируют экспрессию *Xist* при импринтированной и случайной инактивации, они вовлечены в механизмы под-

счета числа X-хромосом на диплоидный набор аутосом и выбора будущей неактивной X-хромосомы [66]. Эти гены менее консервативны. *Xite* выявляется даже не у всех грызунов и не обнаружен у человека [67]. Антисмысловая по отношению к гену *Xist* транскрипция, подобная *Tsix*, обнаружена у человека, однако она не имеет таких же функций, как у мыши [68, 69]. Таким образом, не обнаружено консервативных элементов ХИС, отвечающих за функции «подсчета» и «выбора», а следовательно, функциональные элементы ХИС, регуляция *Xist* и процесса инактивации хотя бы отчасти видоспецифичны [67].

В целом можно отметить, что в ХИС плацентарных млекопитающих гены ядерных РНК, вовлеченных в процесс инактивации, изменяются очень быстро. Меняется их экзон-интронная структура и границы, в процессе эволюции происходит утрата одних и появление новых некодирующих РНК, вовлеченных в реализацию процесса инактивации. На этом фоне замена гена *Rsx* у сумчатых на ген *Xist* у плацентарных млекопитающих выглядит рядовым явлением, которое вполне укладывается в общие тенденции эволюции процесса инактивации.

КОЭВОЛЮЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ И ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ

Процесс инактивации ограничивает обмен генетическим материалом между X-хромосомой и аутосомами

Эволюция половых хромосом млекопитающих и процесса инактивации X-хромосомы происходит взаимосвязано. Необходимость в дозовой компенсации X-сцепленных генов у млекопитающих возникла во время дифференциации половых хромосом, которые изначально были парой гомологичных аутосом. Процесс инактивации X-хромосомы появился после того, как в результате подавления рекомбинации между прото X и прото Y-хромосомами Y-хромосома стала терять гомологи генов X-хромосомы и аккумулировать гены, вовлеченные в гаметогенез у самцов [70]. Гомология на X- и Y-хромосомах сохранялась в небольшом участке, названном псевдоаутосомным районом (PAR), необходимом для правильной конъюгации X- и Y-хромосом в мейозе у самцов. Гены PAR, гомологичные на X- и Y-хромосомах, не нуждаются в дозовой компенсации и избегают инактивации. Процесс инактивации возник, вероятно, у общего предка сумчатых и плацентарных млекопитающих на X-хромосоме, которая по составу была близка к X-хромосоме сумчатых. Дальнейшие транслокации аутосомного материала на предковую X-хромосому, которые наблюдаются у плацентарных, должны были происходить таким образом, чтобы не нару-

шалась дозовая компенсация. В противном случае такие перестройки элиминировались бы отбором. Предполагают, что дозовая компенсация не нарушалась, когда аутосомный материал добавлялся в PAR X-хромосомы, а затем в результате рекомбинации переносился в PAR на Y-хромосому. На начальных этапах аутосомные гены, вновь добавленные в PAR X- и Y-хромосом, не требовали дозовой компенсации. Впоследствии по мере деградации генов в PAR на Y-хромосоме их гомологи на X-хромосоме вовлекались в процесс инактивации. Всего на X-хромосоме млекопитающих произошло пять последовательных транслокаций, в результате которых аутосомные гены добавлялись к предковой X-хромосоме и формировали более молодые эволюционные страты. У современных млекопитающих в наиболее древней (консервативной) части X-хромосомы (рис. 1) сохранилось наименьшее число активных гомологов Y-хромосомы, тогда как в добавленных районах выявлено больше генов, избегающих инактивации и имеющих активный гомолог на Y-хромосоме [71]. Тем не менее на X-хромосоме плацентарных есть гены, которые избегают инактивации, несмотря на то, что их гомолог на Y-хромосоме утрачен. Таким образом, вовлечение генов в процесс инактивации занимает, вероятно, определенное время, а не устанавливается немедленно вслед за утратой Y-гомологов. Кроме того, отмечено, что двукратное уменьшение количества продукта одного гена может не иметь вредных последствий для клетки и организма, и поэтому не нуждается в корректировке дозы генов [72]. По-видимому, дозовая компенсация генов половых хромосом направлена на поддержание коллективных функций генов, например, общей концентрации белков в клетке, которая зависит от множества экспрессирующихся генов. Значительные изменения концентрации цитоплазматических белков могут нарушить градиент концентрации ионов на мембране клетки. Избыток белковых продуктов генов X-хромосомы в результате нарушения инактивации приводит к развитию аутоиммунных заболеваний. Таким образом, нарушение коллективных функций генов может играть роль движущей силы в эволюции дозовой компенсации.

Интересное решение проблемы транслокации аутосомного материала на X-хромосому выявлено у бурозубок *Sorex araneus*. Рекомбинационного переноса транслоцированного фрагмента аутосомы на Y-хромосому у бурозубок не произошло, и теперь их X-хромосома имеет два гомолога. Один соответствует предковой Y-хромосоме (Y_1), другой – транслоцированной аутосоме (Y_2) [73]. Большая часть короткого плеча X-хромосомы (original X) ведет себя как типичная X-хромосома плацентарных млекопи-

тающих – конъюгирует с истинной Y-хромосомой в мейозе у самцов и подвергается инактивации в соматических клетках самок. Добавленный район, который занимает длинное плечо и небольшой прицентромерный район короткого плеча, по поведению идентичен аутосоме – конъюгирует с Y₂ и не подвергается инактивации.

X-хромосомы плацентарных млекопитающих насыщены ретротранспозонами LINE1, которые, по-видимому, вовлечены в распространение и/или поддержание неактивного состояния

Обнаружено, что аутосомные гены, сцепленные с центром инактивации, инактивируются менее эффективно, чем гены X-хромосомы. Предполагали, что, вероятно, X-хромосома аккумулировала специфические последовательности, которые участвуют в распространении и/или поддержании неактивного состояния. М. Лайон [74] отметила, что эту роль могут выполнять ретротранспозоны LINE1, плотность которых у мыши на X-хромосоме больше, чем на аутосомах. Эта гипотеза получила дальнейшее подтверждение при анализе секвенированных геномов млекопитающих. Содержание LINE1 на X-хромосомах мыши, крысы и человека в 2 раза выше, чем на аутосомах. На протяжении X-хромосомы плацентарных LINE1 распределены относительно равномерно, и их доля снижена только в районах, содержащих гены, избегающие инактивации [75, 76]. У южноамериканского сумчатого опоссума *M. domestica* доля LINE1 на X-хромосоме и аутосомах достоверно не отличается, что согласуется с данными о неполной и нестабильной инактивации у сумчатых, и показывает, что повышенное содержание LINE1 действительно связано с их ролью в процессе инактивации, а не обусловлено менее эффективным негативным отбором LINE1 из-за уменьшения частоты мейотической рекомбинации X-хромосомы по сравнению с аутосомами. Экспериментальные данные показывают, что LINE1 могут принимать участие в организации хромосомной территории неактивной X-хромосомы, при этом эволюционно наиболее молодые LINE1 экспрессируются на инактивируемой X-хромосоме и способствуют распространению неактивного состояния [77].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно отметить, что процесс инактивации X-хромосомы у сумчатых и плацентарных млекопитающих имеет общие эпигенетические и, вероятно, молекулярные механизмы (рис. 2). Ключевая особенность процесса инактивации у млекопитающих – скоординированная репрессия генов в масштабах X-хромосомы, по-видимому, достигается за счет распространения по ней некодирующей ядерной РНК. Однако в ходе эволюции у плацентарных произошла замена гена некодирующей ядерной РНК *Rsx* на *Xist*, который, вероятно, лучше, чем его предшественник, способен привлекать на X-хромосому модификации, более подходящие для стабильной инактивации генов. Вокруг гена *Xist* сформировался центр инактивации с элементами, способными производить подсчет и выбор будущих активной и неактивной X-хромосом, что позволило осуществлять реPRESSION одну из двух X-хромосом случайным образом. Кроме того, формированию более полной и стабильной инактивации у плацентарных способствовало привлечение к поддержанию неактивного состояния механизмов метилирования ДНК и обогащение X-хромосомы последовательностями LINE1, позволяющими более эффективно распространять неактивное состояние. Тем не менее эволюция процесса инактивации X-хромосомы у млекопитающих изучена недостаточно. Изложенные в этом обзоре предположения о его происхождении и эволюции не всегда логичны и пока слишком спекулятивны, поскольку опираются, в основном, на феноменологические данные, а не на знания о механизмах, которые при одинаковой феноменологии могут отличаться. Вероятно, дальнейшие исследования молекулярных и эпигенетических механизмов этого процесса позволят восстановить более полную картину эволюции системы дозовой компенсации у млекопитающих. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-31465 мол_а), Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология», Министерством образования и науки РФ (соглашение 8264).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bininda-Emonds O.R., Cardillo M., Jones K.E., MacPhee R.D., Beck R.M., Grenyer R., Price S.A., Vos R.A., Gittleman J.L., Purvis A. // *Nature*. 2007. V. 446. № 7135. P. 507–512.
- Lyon M.F. // *Nature*. 1961. V. 190. № 4773. P. 372–373.
- Escamilla-Del-Arenal M., da Rocha S.T., Heard E. // *Hum. Genet.* 2011. V. 130. № 2. P. 307–327.
- Grant J., Mahadevaiah S.K., Khil P., Sangrithi M.N., Royo H., Duckworth J., McCarrey J.R., Vandeberg J.L., Renfree M.B., Taylor W., et al. // *Nature*. 2012. V. 487. № 7406. P. 254–258.
- Grützner F., Rens W., Tsend-Ayush E., El-Mogharbel N., O'Brien P.C., Jones R.C., Ferguson-Smith M.A., Graves J.A.M. // *Nature*. 2004. V. 432. № 7019. P. 913–917.
- Rens W., Grützner F., O'Brien P.C., Fairclough H., Graves J.A., Ferguson-Smith M.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 46. P. 16257–16261.

7. Rens W., O'Brien P.C., Grützner F., Clarke O., Graphodatskaya D., Tsend-Ayush E., Trifonov V.A., Skelton H., Wallis M.C., Johnston S., et al. // *Genome Biol.* 2007. V. 8. № 11. P. R243.
8. Veyrunes F., Waters P.D., Miethke P., Rens W., McMillan D., Alsop A.E., Grützner F., Deakin J.E., Whittington C.M., Schatzkamer K., et al. // *Genome Res.* 2008. V. 18. № 6. P. 965–973.
9. Deakin J.E., Chaumeil J., Hore T.A., Marshall Graves J.A. // *Chromosome Res.* 2009. V. 17. № 5. P. 671–685.
10. Deakin J.E., Hore T.A., Koina E., Graves J.A.M. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 7. P. e1000140.
11. Ellegren H., Hultin-Rosenberg L., Brunstrom B., Dencker L., Kultima K., Scholz B. // *BMC Biol.* 2007. V. 5. P. 40.
12. Itoh Y., Melamed E., Yang X., Kampf K., Wang S., Yehya N., van Nas A., Replogle K., Band M.R., Clayton D.F., et al. // *J. Biol.* 2007. V. 6. № 1. P. 2.
13. Rens W., Wallduck M.S., Lovell F.L., Ferguson-Smith M.A., Ferguson-Smith A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 41. P. 17657–17662.
14. Wrigley J.M., Graves J.A. // *J. Hered.* 1988. V. 79. № 2. P. 115–118.
15. Kirsch J.A.W., Lapointe F.J., Springer M.S. // *Aust. J. Zool.* 1997. V. 45. № 3. P. 211–280.
16. Richardson B.J., Czuppon A.B., Sharman G.B. // *Nat. New Biol.* 1971. V. 230. № 13. P. 154–155.
17. Sharman G.B. // *Nature.* 1971. V. 230. № 5291. P. 231–232.
18. Cooper D.W., Johnston P.G., Graves J.A.M. // *Sem. Dev. Biol.* 1993. V. 4. № 2. P. 117–128.
19. Hornecker J.L., Samollow P.B., Robinson E.S., Vandeberg J.L., McCarrey J.R. // *Genesis.* 2007. V. 45. № 11. P. 696–708.
20. Hayman D.L., Martin P.G. // *Genetics.* 1965. V. 52. № 6. P. 1201–1206.
21. Johnston P.G., Watson C.M., Adams M., Paull D.J. // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 99. № 1–4. P. 119–124.
22. Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Zakian S.M. // *Bioessays.* 2009. V. 31. № 1. P. 21–28.
23. Heard E., Distech C.M. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 14. P. 1848–1867.
24. Okamoto I., Patrat C., Thépot D., Peynot N., Fauque P., Daniel N., Diabangouaya P., Wolf J.P., Renard J.P., Duranthon V., Heard E. // *Nature.* 2011. V. 474. № 7350. P. 239–240.
25. Takagi N., Sasaki M. // *Nature.* 1975. V. 256. № 5519. P. 640–642.
26. Dindot S.V., Kent K.C., Evers B., Loskutoff N., Womack J., Piedrahita J.A. // *Mamm. Genome.* 2004. V. 15. № 12. P. 966–974.
27. Mahadevaiah S.K., Royo H., VandeBerg J.L., McCarrey J.R., Mackay S., Turner J.M. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 17. P. 1478–1484.
28. Chaumeil J., Waters P.D., Koina E., Gilbert C., Robinson T.J., Graves J.A.M. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 4. P. e19040.
29. Kohlmaier A., Savarese F., Lachner M., Martens J., Jenuwein T., Wutz A. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 7. P. e171.
30. Wutz A., Rasmussen T. P., Jaenisch R. // *Nat. Genet.* 2002. V. 30. № 2. P. 167–174.
31. Pullirsch D., Hartel R., Kishimoto H., Leeb M., Steiner G., Wutz A. // *Development.* 2010. V. 137. № 6. P. 935–943.
32. Wutz A., Jaenisch R. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. № 4. P. 695–705.
33. Helbig R., Fackelmayer F.O. // *Chromosoma.* 2003. V. 112. № 4. P. 173–182.
34. Sarma K., Levasseur P., Aristarkhov A., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 51. P. 22196–22201.
35. Hasegawa Y., Brockdorff N., Kawano S., Tsutsui K., Nakagawa S. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. № 3. P. 469–476.
36. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Shilov A.G., Nesterova T.B., Vandeberg J.L., Zakian S.M. // *Chromosoma.* 2011. V. 120. № 2. P. 177–183.
37. Деметьева Е.В. Статус экспрессии генов и модификации хроматина на активной и неактивной X-хромосоме у обычных полевых: Автореф. дис. канд. биол. наук. Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2010. 17 с.
38. Chadwick B.P., Willard H.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 50. P. 17450–17455.
39. Brinkman A.B., Roelofsen T., Pennings S.W., Martens J.H., Jenuwein T., Stunnenberg H.G. // *EMBO Rep.* 2006. V. 7. № 6. P. 628–634.
40. Chadwick B.P. // *Chromosoma.* 2007. V. 116. № 2. P. 147–157.
41. Coppola G., Pinton A., Joudrey E.M., Basrur P.K., King W.A. // *Sex Dev.* 2008. V. 2. № 1. P. 12–23.
42. Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Dementyeva E.V., Zakian S.M. // *Mamm. Genome.* 2009. V. 20. № 9–10. P. 644–653.
43. Csankovszki G., Nagy A., Jaenisch R. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. № 4. P. 773–784.
44. Zhao J., Sun B.K., Erwin J.A., Song J.J., Lee J.T. // *Science.* 2008. V. 322. № 5902. P. 750–756.
45. Hellman A., Chess A. // *Science.* 2007. V. 315. № 5815. P. 1141–1143.
46. Kratzer P.G., Chapman V.M., Lambert H., Evans R.E., Liskay R.M. // *Cell.* 1983. V. 33. № 1. P. 37–42.
47. Zeng S.M., Yankowitz J. // *Placenta.* 2003. V. 24. № 2–3. P. 270–275.
48. Reik W., Lewis A. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 5. P. 403–410.
49. Singh N., Ebrahimi F.A., Gimelbrant A.A., Ensminger A.W., Tackett M.R., Qi P., Gribnau J., Chess A. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 3. P. 339–341.
50. Ohlsson R., Paldi A., Graves J.A.M. // *Trends Genet.* 2001. V. 17. № 3. P. 136–141.
51. Turner J.M., Mahadevaiah S.K., Elliott D.J., Garchon H.J., Pehrson J.R., Jaenisch R., Burgoyne P.S. // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. № 21. P. 4097–4105.
52. Kalantry S., Purushothaman S., Bowen R.B., Starmer S., Magnuson T. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7255. P. 647–651.
53. Chaumeil J., Le Baccon P., Wutz A., Heard E. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 16. P. 2223–2237.
54. Clemson C.M., Hall L.L., Byron M., McNeil J., Lawrence J.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 20. P. 7688–7693.
55. Zhang L.F., Huynh K.D., Lee J.T. // *Cell.* 2007. V. 129. № 4. P. 693–706.
56. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L., Eggen A., Avner P., Duret L. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 6. P. 894–908.
57. Johnston C.M., Newall A.E., Brockdorff N., Nesterova T.B. // *Genomics.* 2002. V. 80. № 2. P. 236–244.
58. Tian D., Sun S., Lee J.T. // *Cell.* 2010. V. 143. № 3. P. 390–403.
59. Chureau C., Chantalat S., Romito A., Galvani A., Duret L., Avner P., Rougeulle C. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 4. P. 705–718.
60. Duret L., Chureau C., Samain S., Weissenbach J., Avner P. // *Science.* 2006. V. 312. № 5780. P. 1653–1655.
61. Elisaphenko E.A., Kolesnikov N.N., Shevchenko A.I., Rogozin I.B., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 6. P. e2521.
62. Hore T.A., Koina E., Wakefield M.J., Graves J.A. // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. № 2. P. 147–161.
63. Davidow L.S., Breen M., Duke S.E., Samollow P.B., McCarrey J.R., Lee J.T. // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. № 2. P. 137–146.
64. Shevchenko A.I., Zakharova I.S., Elisaphenko E.A., Kolesnikov N.N., Whitehead S., Bird C., Ross M., Weidman J.R., Jirtle

- R.L., Karamysheva T.V., et al. // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. № 2. P. 127–136.
65. Nesterova T.B., Slobodyanyuk S.Y., Elisaphenko E.A., Shevchenko A.I., Johnston C., Pavlova M.E., Rogozin I.B., Kolesnikov N.N., Brockdorff N., Zakian S.M. // *Genome Res.* 2001. V. 11. № 5. P. 833–849.
66. Lee J.T. // *Science.* 2005. V. 309. № 5735. P. 768–771.
67. Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Elisaphenko E.A., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e22771.
68. Migeon B.R., Lee C.H., Chowdhury A.K., Carpenter H. // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. № 2. P. 286–293.
69. Migeon B.R. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 3. P. 337–338.
70. Graves J.A. // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. Part A.* 1991. V. 99. № 1–2. P. 5–11.
71. Carell L., Willard H.F. // *Nature.* 2005. V. 434. № 7031. P. 400–404.
72. Forsdyke D.R. // *Bioessays.* 2012. V. 34. № 11. P. 930–933.
73. Pack S.D., Borodin P.M., Serov O.L., Searle J.B. // *Chromosoma.* 1993. V. 102. № 5. P. 355–360.
74. Lyon M.F. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1998. V. 80. № 1–4. P. 133–137.
75. Bailey J.A., Carrel L., Chakravarti A., Eichler E.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6634–6639.
76. Mikkelsen T.S., Wakefield M.J., Aken B., Amemiya C.T., Chang J.L., Duke S., Garber M., Gentles A.J., Goodstadt L., Heger A., et al. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7141. P. 167–177.
77. Chow J.C., Ciaudo C., Fazzari M.J., Mise N., Servant N., Glass J.L., Attreed M., Avner P., Wutz A., Barillot E., et al. // *Cell.* 2010. V. 141. № 6. P. 956–969.

УДК 575.1

Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории

А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв, А. Н. Богомазова*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

*E-mail: bogomazova@vigg.ru

Поступила в редакцию 20.12.2012

РЕФЕРАТ В женских соматических клетках млекопитающих работает эпигенетический механизм дозовой компенсации, включающий инактивацию одной из двух X-хромосом через формирование факультативного гетерохроматина. В отличие от плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) мыши, статус X-хромосомы в плюрипотентных клетках человека является эпигенетически пластичным признаком. Известно, что для гетерохроматина свойственна поздняя репликация в поздней S-фазе клеточного цикла после репликации эухроматина. Это характерно и для факультативного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы. Принято считать, что неактивная X-хромосома в клетках млекопитающих всегда имеет большую конденсацию в интерфазном ядре. Предполагается, что именно плотная упаковка определяет позднюю репликацию инактивированной X-хромосомы. Методом полнохромосомной ДНК-гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах мы показали, что ПСК человека с инактивированной X-хромосомой могут иметь как релаксированную, так и компактную хромосомную территорию неактивной X-хромосомы. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы также не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории. Тем не менее для перехода X-хромосомы к активному состоянию при ее реактивации и для синхронной репликации необходимым условием является декомпактизация хромосомной территории X-хромосомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, хромосомные территории, X-хромосома, поздняя репликация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; H3K27me3 – трижды метилированный лизин 27 гистона H3; H3K4me2 – дважды метилированный лизин 4 гистона H3; H3K9me3 – трижды метилированный лизин 9 гистона H3; Xi – инактивированная X-хромосома; Xa – активная X-хромосома; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*; BrdU – 5-бromo-2-дезоксисуридин.

ВВЕДЕНИЕ

Структура хроматина и архитектура ядра являются важнейшими элементами регуляции основных ядерных генетических процессов: транскрипции и репликации. Известно, что хромосомы в интерфазном ядре занимают определенные, не перекрывающиеся друг с другом области, формируя так называемые хромосомные территории, причем более плотно упакованный гетерохроматин располагается преимущественно в периферийной и приядрышковой зонах ядра [1]. Репликация деконденсированного эухроматина и плотно упакованного гетерохроматина разнесена и в пространстве, и во времени. Репликация декон-

денсированного эухроматина происходит в начале S-фазы, в то время как зоны конденсированного хроматина реплицируются в конце S-фазы [2]. Т. Ryba и соавт. предположили, что поздняя репликация плотно упакованных хроматиновых доменов может быть обусловлена трудным доступом к этим регионам факторов инициации репликации [3].

Один из примеров массивного гетерохроматинного домена внутри ядра в женских соматических клетках млекопитающих – инактивированная X-хромосома, которая в результате действия механизмов дозовой компенсации утрачивает способность к транскрипции, формирует компактное

тельце Барра на периферии ядра и реплицируется в конце S-фазы [4].

Интересную возможность для изучения связи различных эпигенетических состояний хроматина, организации хромосомных территорий в интерфазном ядре и регуляции репликации предоставляет вариабельность статуса инактивации X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека [5–7].

В настоящее время описаны линии женских эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека с двумя активными X-хромосомами, с одной инактивированной X-хромосомой, а также линии ЭСК человека с инактивированной X-хромосомой без классических цитологических признаков инактивации. По поводу индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека на сегодня нет однозначного мнения о возможности полной реактивации X-хромосомы и долговременного поддержания этого активного статуса в культуре, но, несомненно, X-хромосома при репрограммировании претерпевает ряд значительных эпигенетических изменений, связанных, по крайней мере, с частичной реактивацией [8–10]. Целью нашего исследования стал поиск взаимосвязи между временем репликации X-хромосом в ПСК человека с разным статусом инактивации X-хромосомы и степенью компактизации их хромосомных территорий.

Наши результаты показывают, что репликация неактивной X-хромосомы в поздней S-фазе клеточного цикла может быть не связана с компактной организацией хромосомной территории, и поздно реплицирующаяся и транскрипционно неактивная X-хромосома в женских ПСК может находиться в релаксированном состоянии. Тем не менее при переходе X-хромосомы в активное состояние, сопровождающееся синхронизацией репликации гомологичных X-хромосом, происходит релаксация ее хромосомной территории.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры

Линии ЭСК человека hESM01, hESM04 описаны ранее [11]. Линия HUES 9 любезно предоставлена ее автором Дугласом Мелтоном (Гарвардский университет, США) [12]. Линия эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) получена согласно [13]. Линии ИПСК, клоны iPS-6, iPS-7 с неполным репрограммированием и клон iPS-12 с полным репрограммированием получены из клеток HUVES с помощью лентивирусной трансфекции четырьмя факторами транскрипции: KLF4, OCT4, SOX2 и C-MYC [14], и описаны в [15]. Линия ИПСК MA-02

получена из фибробластов кожи по ранее описанной методике [16].

Линии ПСК культивировали в среде mTeSR1 (StemCell Technologies) на чашках Петри, покрытых матригелем (Matrigel, BD). Линию HUVES культивировали в DMEM/F12 с добавлением 15% FBS, 5 нг/мл hrbFGF (Peprotech), 20 нг/мл hrVEGF (Peprotech), 1% заменимых аминокислот, 2 мМ L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 нг/мл стрептомицина (все от Hyclone). Все клеточные линии культивировали в 5% CO₂ при 37°C.

Иммуноокрашивание

Иммуноокрашивание ядер и метафазных хромосом проводили как описано [8]. Использовали первичные антитела: поликлональные антитела кролика к H3K27me3 (Millipore, разведение 1 : 500), поликлональные антитела кролика к H3K4me2 (Abcam, 1 : 200) и моноклональные антитела мыши к H3K4me2 (Abcam, 1 : 100), поликлональные антитела кролика к H3K9me3 (Abcam, 1 : 200). Использовали вторичные козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1 : 1000), или вторичные козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1 : 1000). ДНК ядер и метафазных хромосом окрашивали DAPI, наносили на препарат Vectashield (Vector Laboratories), покрывали препарат покровным стеклом.

РНК-FISH

РНК-FISH проводили, как описано в [17], с флуоресцентно мечеными ДНК-пробами ВАС-клонов (Empire Genomics). Использовали следующие ВАС-клоны: RP11-13M9 для локуса *XIST* и RP11-1104L9 для локуса *POLA1*.

Гибридизация *in situ* с полнохромосомной пробой (пейнтинг)

Для приготовления препаратов интерфазных ядер клетки обрабатывали трипсином (0.05% Trypsin, Hyclone). Трипсин инактивировали с помощью FBS (Hyclone). Обрабатывали гипотоническим раствором (0.075 М KCl) в течение 18 мин при 37°C. Клетки фиксировали двумя фиксаторами (смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 6 : 1 и в соотношении 3 : 1 соответственно). Фиксированные клетки хранили в фиксаторе (3 : 1) при –20°C. Суспензию фиксированных клеток наносили на холодное мокрое стекло, готовые препараты сушили на воздухе в течение 1 сут. Для улучшения качества FISH препараты инкубировали в 0.25% параформальдегиде в течение 10 мин при комнатной температуре, предобработанные препараты дегидратировали последовательно в 70, 80 и 96% этаноле, а затем обра-

батывали 0.002% раствором пепсина (Sigma) в 0.01 M HCl в течение 30 с при 37°C и снова дегидратировали в этаноле. Денатурацию проводили в 70% формамиде в двукратном SSC-буфере в течение 5 мин при 75°C с последующей дегидратацией в этаноле. Полнохромосомные пробы к хромосомам X и 8 были произведены компанией MetaSystems. Далее препараты окрашивали DAPI, наносили на препарат Vectashield (Vector Laboratories), покрывали препарат покровным стеклом.

Детекция времени репликации с использованием 5-бромо-2-дезоксигидроуридина (BrdU)

Клетки инкубировали в присутствии 5-бромо-2-дезоксигидроуридина в конечной концентрации 1 мкМ в течение 20 мин за 6–10 ч до фиксации. Колцемид (Demicolcine solution, Sigma) в конечной концентрации 0.2 мкг/мл добавляли в среду с культивируемыми клетками за 1 ч до фиксации. Препараты метафазных хромосом готовили так же, как описано выше для интерфазных ядер. Для денатурации ДНК препараты метафазных хромосом обрабатывали 70% формамидом в двукратном SSC-буфере в течение 5 мин при 75°C, далее их дегидратировали в этаноле и инкубировали с первичными мышинными антителами к BrdU (Sigma, 1 : 1000) в течение 2 ч при 37°C. Отмывку производили в растворе PBS–0.1% Твин-20. Затем препараты инкубировали с вторичными козыми антителами к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1 : 1000), в течение 1 ч при комнатной температуре и окрашивали DAPI. Идентификацию X-хромосомы проводили по инвертированному DAPI-бэндингу или с помощью FISH с X-специфической пробой.

Микроскопия и фотографирование

Препараты метафазных хромосом и интерфазных ядер анализировали на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Цветные фотографии микрообъектов в псевдоцветах получали с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss).

Сравнение степени компактизации хромосом, расчет дисперсии

Для объективного сравнения степени компактизации двух X-хромосом в каждой отдельной клетке мы использовали программу, специально разработанную для данного эксперимента. Объяснение алгоритма обсчета приведено ниже.

Рассмотрим канал микрофотографии интерфазных ядер, в котором хранится информация о яркости свечения окрашенных хромосомных территорий.

Пусть x, y – координаты на плоскости точек изображения, а $P_s(x, y)$ – функция яркости точки изо-

бражения от координаты. Сначала отсекали фоновый уровень свечения линейным преобразованием:

$$P(x, y) = k \cdot P_s(x, y) + b.$$

Обозначим область изображения, в которой находится анализируемая хромосомная территория, как G . Для каждой хромосомной территории вычисляли параметры P_0, x_0, y_0 следующим образом:

$$P_0 = \iint_G P(x, y) dx dy$$

$$x_0 = \frac{1}{P_0} \iint_G (x \cdot P(x, y)) dx dy$$

$$y_0 = \frac{1}{P_0} \iint_G (y \cdot P(x, y)) dx dy.$$

После чего выполняли замену переменных $P(x, y) \rightarrow P(r, \varphi)$ согласно формулам перехода, приведенным ниже:

$$\begin{cases} x - x_0 = r \cdot \cos(\varphi) \\ y - y_0 = r \cdot \sin(\varphi). \end{cases}$$

Данная замена переменных есть не что иное, как переход в полярные координаты с центром в точке (x_0, y_0) .

Затем проводили усреднение функции $P(r, \varphi)$ по переменной φ таким образом – $P(r, \varphi) \rightarrow P(r)$. Формула усреднения приведена ниже.

$$P(r) = \frac{\int_0^{2\pi} P(r, \varphi) d\varphi}{2\pi}$$

Функцию $P(r)$ нормировали $P(r) \rightarrow P_n(r)$.

$$P_n(r) = \frac{P(r)}{\int_r P(r) dr}$$

Функцию $P_n(r)$ аппроксимировали нормальным распределением $N(r)$ методом наименьших квадратов:

$$N(r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}},$$

т.е. подбирали такое значение σ , при котором:

$$\int_r (P_n(r) - N(r))^2 dr \rightarrow \min.$$

Таблица 1. Сводная таблица оценки статуса X-хромосом в плюрипотентных и соматических клетках человека, использованных в работе

Линия клеток	H3K4me2, марка активного хроматина	H3K27me3, марка гетерохроматина	H3K9me3, марка гетерохроматина	PHK-FISH		Статус X-инактивации
				XIST-облако	Экспрессия <i>POLA1</i>	
HUES 9	+	-	Отдельные бэнды	-	Биаллельная	XaXa*
hESM01	+	-	+	-	Моноаллельная	XaXi *
hESM04	-	+	+	+	Моноаллельная	XaXi
iPS MA-02	+	-	-	-	Биаллельная	XaXa
HUVEC	-	+	+	+	Моноаллельная	XaXi
iPS-6	-	+	+	+	То же	XaXi
iPS-7	-	+	+	+	«	XaXi
iPS-12	+	+	+	+	«	XaXi

*XaXa – линии с двумя активными X-хромосомами, XaXi – линии, в которых одна X-хромосома неактивна.

Параметр σ^2 является дисперсией нормального распределения, именно он выдавался программой в качестве результата анализа и далее использовался для оценки компактизации хромосомных территорий. В работе получены значения σ^2 для каждой фотографии X-хромосомы каждого ядра во всех линиях клеток.

Для каждого отдельно взятого ядра рассчитывали отношение дисперсии хромосомы с большим значением σ^2 к дисперсии с меньшим значением σ^2 . В качестве контроля и определения пороговых значений отношения дисперсий двух хромосом σ_1^2/σ_1^2 использовали сравнение со значением σ_1^2/σ_1^2 для двух аутосом в одной клетке. В результате сравнения аутосом было выявлено пороговое значение $\sigma_1^2/\sigma_1^2 = 2.1$. Таким образом, все клетки со значением $\sigma_1^2/\sigma_1^2 \leq 2.1$ для X-хромосом считались обладателями двух декомпактизованных (релаксированных) хромосомных территорий. В результате анализа отношения дисперсий X-хромосом в плюрипотентных клетках (линия, описанная ранее как линия с одной неактивной X-хромосомой, hESM04 [11]) выявлено и второе пороговое значение $\sigma_1^2/\sigma_1^2 = 3$. Таким образом, все

клетки со значением $\sigma_1^2/\sigma_1^2 \geq 3$ для X-хромосом считались обладателями одной компактной и одной релаксированной хромосомной территории. На основе этого анализа были получены данные, приведенные в табл. 2 ниже. В каждой линии клеток анализировали от 50 до 100 ядер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика статуса инактивации X-хромосомы в ЭСК и ИПСК человека

Статус X-хромосом во всех использованных в работе линиях клеток был охарактеризован ранее при помощи обычных критериев: наличия/отсутствия облака XIST-PHK в интерфазном ядре, наличия/отсутствия фокального окрашивания антителами к H3K27me3 в интерфазных ядрах; моноаллельной/биаллельной экспрессии гена *POLA1*. Данные, в том числе опубликованные нами ранее для некоторых линий [8, 11], обобщены в табл. 1. Основным и определяющим критерием состояния X-хромосом была моноаллельная или биаллельная экспрессия гена *POLA1*.

Как видно из *табл. 1*, не полностью репрограммированные, так называемые несовершенные, клоны ИПСК iPS-6 и iPS-7 проявляли все признаки инактивированной X-хромосомы, как и исходные соматические клетки: облако XIST-РНК и фокус H3K27me3 в интерфазном ядре; в них наблюдалась моноаллельная экспрессия гена *POLA1*. Полностью репрограммированный клон iPS-12 проявлял признаки частичной реактивации по наличию H3K4me2 на обеих X-хромосомах [8], но имел моноаллельную экспрессию *POLA1*. Линия ЭСК hESM01 содержала транскрипционно неактивную X, но утратила такие маркеры инактивации, как облако XIST-РНК и фокус H3K27me3 в интерфазных ядрах.

Линию ИПСК MA-02 и линию ЭСК HUES 9 по всем этим критериям можно отнести к линиям с активной X-хромосомой. В этих линиях не выявлено XIST-облака методом РНК-FISH; фокального окрашивания антителами к H3K27me3 в интерфазных ядрах; наблюдалось окрашивание антителами к маркеру активного хроматина H3K4me2 на обеих X-хромосомах и биаллельная экспрессия гена *POLA1*. Следует отметить, что реактивация X-хромосомы при репрограммировании клеток человека – довольно редкое событие. Большинство клонов, получаемых при обычном репрограммировании, имеют одну X-хромосому в неактивном состоянии [9, 18 и собственные наблюдения].

Во всех приведенных в *табл. 1* линиях ЭСК и ИПСК проведен анализ времени репликации X-хромосом.

Время репликации X-хромосом

Известно, что для гетерохроматина свойственна поздняя репликация, а именно репликация в поздней S-фазе клеточного цикла после репликации эухроматина. В частности, это характерно и для факультативного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы [2]. Для определения времени репликации X-хромосом в S-фазе клеточного цикла был проведен эксперимент по включению BrdU в ново-синтезируемые цепи ДНК при репликации.

После фиксации клеток и приготовления препаратов метафазных хромосом включенный BrdU выявляли с помощью иммуоцитохимического окрашивания антителами против BrdU.

Мы получили картины поздней репликации X-хромосомы во всех линиях с инактивированной X-хромосомой как в соматических клетках HUVEC, так и в линиях ЭСК (hESM01 и hESM04) и ИПСК (iPS-6, iPS-7, iPS-12). На *рис. 1* показаны два типа включения BrdU в цепи ДНК, наблюдаемые при поздней репликации X-хромосомы. В первом варианте наблюдается включение BrdU во все хромосо-

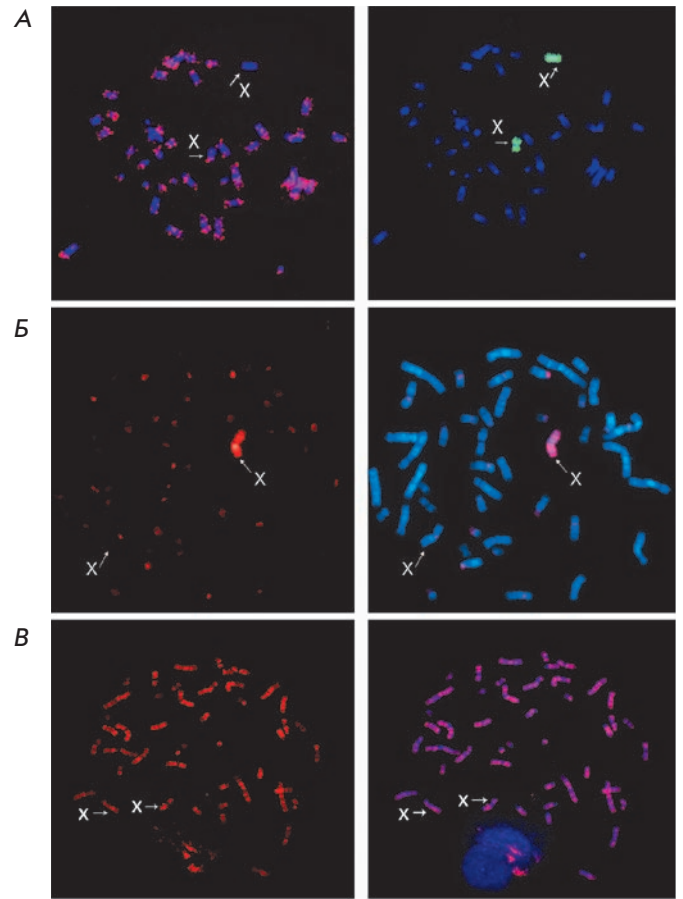


Рис. 1. Определение времени репликации X-хромосом в ПСК человека. Хромосомы X обозначены буквами и указаны стрелками. А, Б – Репрезентативные фотографии асинхронной репликации гомологичных X-хромосом. Репликация неактивной X-хромосомы в поздней S-фазе клеточного цикла. Показаны метафазы клеток линии hESM04. А – BrdU (красный, левая фотография) включен во все хромосомы, кроме одной. На правой фотографии показаны результаты гибридизации этой же метафазы с пробой на X-хромосому (показано зеленым). Хромосомы окрашены синим (DAPI). Б – Включение BrdU (красный, левая фотография) только в одну из хромосом. На этой же метафазе наблюдается включение BrdU в прицентромерный гетерохроматин. На правой фотографии показано совмещение окрашивания BrdU с окрашиванием DAPI (синий), которое использовалось для идентификации X-хромосом. В – Репрезентативная фотография синхронной репликации гомологичных X-хромосом у линий плюрипотентных клеток с двумя активными X-хромосомами. Показана метафаза ЭСК HUES 9. Включение BrdU (красный, левая фотография) происходит во все хромосомы, нет включения в прицентромерные участки хромосом. На правой фотографии показано совмещение окрашивания BrdU с окрашиванием DAPI (синий), которое использовали для идентификации X-хромосом

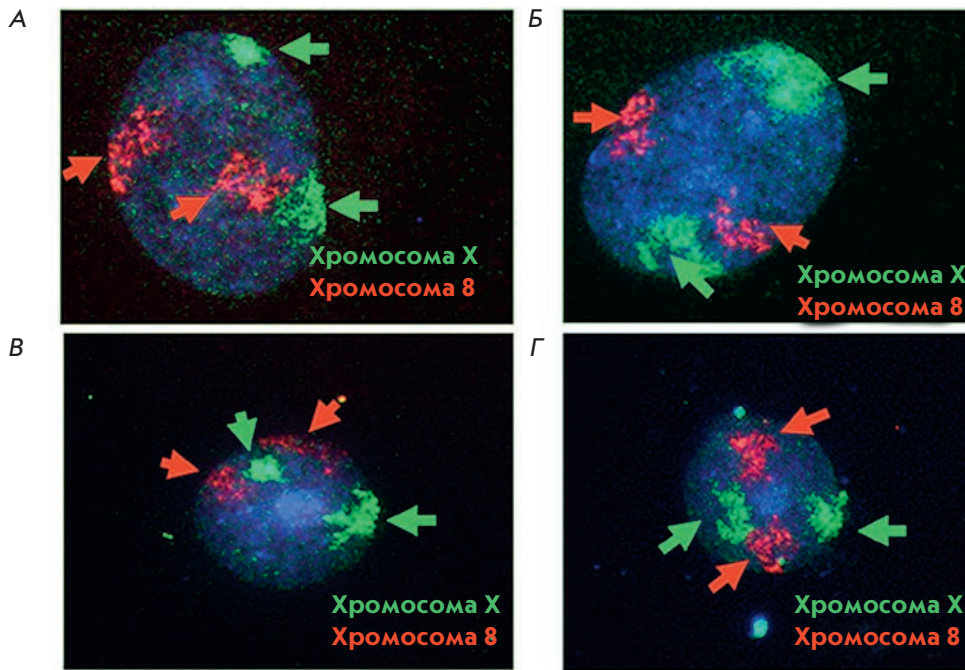


Рис. 2. Пример двух типов компактизации X-хромосом у ПСК человека. А, В – ядро с одной обширной и одной компактной территорией X-хромосомы (на примере линии ЭСК hESM04); Б, Г – две обширные релаксированные территории X-хромосомы (на примере линии ИПСК МА-02). Территории X-хромосом окрашены зеленым цветом; хромосомы 8 – красным, тотальная ДНК ядра – синим цветом (DAPI); зелеными стрелками показаны X-хромосомы, красными – хромосомы 8

мы, кроме одной из X-хромосом (рис. 1А). Во втором варианте BrdU включается в прицентромерный гетерохроматин, а также в р- и q-плечи одной из хромосом метафазной пластинки – одной из X-хромосом, согласно результатам FISH или инвертированного DAPI-бэндинга (рис. 1В). Одновременная репликация с прицентромерным конститутивным гетерохроматином подтверждает, что наблюдаемый тип включения BrdU соответствует репликации в поздней S-фазе.

Гомологичные X-хромосомы в линиях ПСК с двумя активными X-хромосомами (HUES 9, МА-02) реплицируются почти синхронно, поэтому гомологичные хромосомы практически неотличимы друг от друга по характеру включения BrdU. На рис. 1В показан пример синхронной репликации X-хромосом.

Далее было решено оценить корреляцию между временем репликации X-хромосом и степенью компактизации их хромосомных территорий.

Степень компактизации X-хромосом в интерфазном ядре не всегда коррелирует со статусом X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека и временем их репликации

Для определения степени конденсации хроматина мы сравнивали между собой территории двух X-хромосом одного ядра на плоских препаратах интерфазных ядер. Данный метод приготовления препаратов уже использовали ранее для исследования территорий хромосом [19]. В качестве контроля рас-

пределения хромосом на препарате мы использовали одновременное сравнение с аутосомой (хромосомой 8). Аутосомы в клетках млекопитающих находятся в одинаковом эпигенетическом состоянии, и размеры их территорий не различаются. Сравнение территорий хромосом осуществляли с помощью алгоритма (см. «Экспериментальную часть») и сравнения значений дисперсий для каждой индивидуальной хромосомы. Степень компактизации X-хромосомных территорий внутри одного ядра сравнивали с использованием ядер, на которых отчетливо выявляли две несмыкающиеся зоны гибридизации с ДНК-пробой к X-хромосоме. Ядра плюрипотентных клеток распределялись на два типа без промежуточных форм: (1) ядра с одной обширной территорией X-хромосомы с низкой плотностью окраски и одной компактной территорией с высокой плотностью окраски (рис. 2А,В); (2) ядра с двумя обширными территориями X-хромосом с одинаковой плотностью окраски (рис. 2Б,Г). Результаты анализа распределения ядер плюрипотентных клеток по степени компактизации X-хромосом представлены на рис. 3. Показано соотношение (%) компактных и релаксированных территорий во всех линиях клеток. Хромосомные территории в плюрипотентных клетках с двумя активными X-хромосомами в подавляющем большинстве просчитанных ядер (более 90%) были релаксированными.

В линиях клеток, где процесс репрограммирования не завершился полностью, т.е. в клонах, не являющихся истинно плюрипотентными (iPS-6

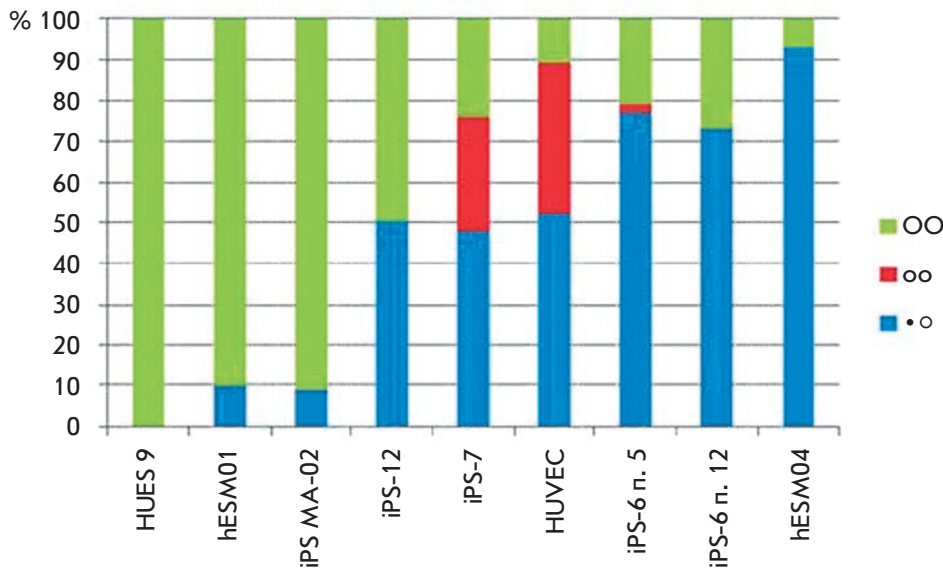


Рис. 3. Процентное соотношение ядер с разной степенью компактизации хромосомных территорий в ПСК человека и линии эндотелиальных клеток HUVEC. OO – ядра, несущие две декомпактизированные (релаксированные) хромосомные территории (обозначены на диаграмме зеленым цветом); •O – ядра, несущие одну компактную и одну релаксированную хромосомную территорию (синий цвет); oo – «соматический» тип компактизации с ядрами, несущими две небольшие компактные хромосомные территории (красный цвет)

и iPS-7), наблюдался также третий тип состояния конденсированности хроматина. В этом случае две территории X-хромосом слабо различаются по размеру и обе имеют большую степень конденсации хроматина, так же как и аутосомы в этих клетках и в преобладающей части клеток HUVEC, которые и были изначально объектом репрограммирования (рис. 3). Следует отметить, что в некоторых работах по изучению организации территорий X-хромосом в соматических клетках также не выявлено различий в объеме территорий активной и неактивной X-хромосомы [2, 20, 21]. Различие между соматическими и плюрипотентными клетками может объясняться значительно большей пластичностью ядерного хроматина в плюрипотентных клетках по сравнению с более компактным хроматином соматических клеток [1, 22]. Интересно отметить, что в процессе культивирования клона ИПСК iPS-6 с 5-го по 12-й пассаж клетки утратили хромосомную территорию «соматического» типа, и на более позднем пассаже большинство клеток имели одну компактную и одну релаксированную территорию X-хромосом.

Результаты сопоставления степени компактизации X-хромосом и времени их репликации представлены в табл. 2.

Большинство ядер в клетках линии hESM04 имели одну компактную и одну релаксированную территорию X-хромосомы (рис. 2), что сопровождалось выраженной асинхронной репликацией X-хромосом. Тем не менее корреляции между поздней асинхронной репликацией и компактностью хромосомной тер-

ритории Xi не наблюдалось в других линиях плюрипотентных клеток.

Как видно из табл. 2, несмотря на то, что линия ЭСК hESM01 имела обе X-хромосомные территории в релаксированном состоянии, репликация X-хромосом в этой линии происходила асинхронно, с репликацией одной из X-хромосом в поздней S-фазе. У клона ИПСК iPS-12 половина ядер имела две одинаковые X-хромосомные территории в релаксированном состоянии, тем не менее, несмотря на частичные цитологические признаки реактивации (наличие H3K4me2, табл. 1), одна из X-хромосом реплицировалась в поздней S-фазе во всех проанализированных клетках ($N > 20$) и имела статус Xi.

Линии ЭСК HUES 9 и ИПСК MA-02, у которых гомологичные X-хромосомы реплицировались практически синхронно и ни одна из X-хромосом не характеризовалась поздней репликацией, имели две релаксированные территории X-хромосом (во всех ядрах в случае HUES 9 и в подавляющем большинстве ядер MA-02) (табл. 2).

Таким образом, суммируя данные, полученные на всех использованных в работе клеточных линиях, можно предположить, что статус Xi может сохраняться в плюрипотентных клетках без формирования классического «тельца Барра», т.е. компактно упакованной хромосомной территории. Тем не менее активный статус обеих X-хромосом и переход к синхронной репликации при репрограммировании требуют нахождения обеих X-хромосом в релаксированном состоянии в интерфазном ядре. При репрограммировании до плюрипотентного со-

Таблица 2. Сравнение компактизации хромосомных территорий X-хромосом в интерфазном ядре и времени их репликации

Линия клеток	•О, %*	оо, %*	ОО, %*	Репликация
HUES 9	0		100	Синхронная не поздняя
hESM04	93		7	Асинхронная, поздняя у Xi
hESM01	10		90	То же
HUVEC	52	37	11	«
iPS-7	48	28	24	«
iPS-6 п. 5	77	2	21	«
iPS-6 п. 12	73		27	«
iPS-12	50		50	«
iPS MA-02	3		97	Синхронная не поздняя

*•О – ядра, несущие одну компактную и одну релаксированную хромосомные территории; оо – ядра, несущие две небольшие компактные хромосомные территории («соматический» тип компактизации); ОО – ядра, несущие две декомпактизированные (релаксированные) хромосомные территории.

стояния в тех случаях, когда происходит частичная или полная реактивация Xi, релаксация хромосомной территории происходит, скорее всего, раньше, чем исчезновение основных марок гетерохроматина H3K27me3 и H3K9me3, как видно на примере клона ИПСК iPS-12.

Ранее было показано, что длительное культивирование «несовершенных» ИПСК часто ведет к завершению репрограммирования, приобретению плюрипотентного состояния и потере характеристик соматических клеток. Изменение компактизации территорий X-хромосомы, которая произошла в процессе культивирования клона ИПСК iPS-6, показывает, что этот параметр может быть дополнительным маркером репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В наших исследованиях показано, что ПСК человека с инактивированной X-хромосомой могут иметь как релаксированную, так и компактную хромо-

сомную территорию неактивной X-хромосомы. Линии ЭСК, в которых обе X-хромосомы активны, или линии ИПСК, в которых X-хромосома реактивировалась в процессе репрограммирования, имеют декомпактизированные хромосомные территории X в интерфазном ядре.

Таким образом, можно заключить, что в ПСК человека существует механизм поддержания инактивированного состояния X-хромосомы, который не зависит напрямую от степени компактизации ее хромосомной территории в интерфазном ядре. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы также не зависит от степени ее компактизации.

С другой стороны, для перехода к активному состоянию X-хромосомы при ее реактивации и синхронной репликации необходима декомпактизация территории X-хромосомы.

Работа поддержана Программой Правительства Москвы и РФФИ (гранты № 11-04-01212-а и 10-04-01736-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bártová E., Galiová G., Krejčí J., Harnicarová A., Strásák L., Kozubek S. // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 3690–3702.
2. Visser A.E., Eils R., Jauch A., Little G., Bakker P.J., Cremer T., Aten J.A. // *Exp. Cell Res.* 1998. V. 243. P. 398–407.
3. Ryba T., Hiratani I., Lu J., Itoh M., Kulik M., Zhang J., Schulz T.C., Robins A.J., Dalton S., Gilbert D.M. // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 761–770.
4. Plath K., Mlynarczyk-Evans S., Nusinow D.A., Panning B. // *Annu. Rev. Genet.* 2002. V. 36. P. 233–278.
5. Hoffman L.M., Hall L., Batten J.L., Young H., Pardasani D., Baetge E.E., Lawrence J., Carpenter M.K. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 1468–1478.
6. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4820–4825.
7. Shen Y., Matsuno Y., Fouse S.D., Rao N., Root S., Xu R., Pel-

- legrini M., Riggs A.D., Fan G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 4709–4714.
8. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. P. 937–946.
9. Tchieu J., Kuoy E., Chin M.H., Trinh H., Patterson M., Sherman S.P., Aimiwu O., Lindgren A., Hakimian S., Zack J.A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. P. 329–342.
10. Marchetto M.C., Carromeu C., Acab A., Yu D., Yeo G.W., Mu Y., Chen G., Gage F.H., Muotri A.R. // *Cell*. 2010. V. 143. P. 527–539.
11. Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V., Rubtsov N.B., Kiselev S.L. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 284–293.
12. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. P. 1353–1356.
13. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdoles M. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 481–485.
14. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
15. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 2. P. 91–92.
16. Shutova M.V., Chestkov I.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Springer Protocols Handbook ser.* 2012. P. 133–149.
17. Bacher C.P., Guggiari M., Brors B., Augui S., Clerc P., Avner P., Eils R., Heard E. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 293–299.
18. Bruck T., Benvenisty N. // *Stem Cell Res.* 2011. V. 6. P. 187–193.
19. Federico C., Cantarella C.D., Di Mare P., Tosi S., Saccone S. // *Chromosoma*. 2008. V. 117. P. 399–410.
20. Eils R., Dietzel S., Bertin E., Schröck E., Speicher M.R., Ried T., Robert-Nicoud M., Cremer C., Cremer T. // *Cell Biol.* 1996. V. 135. P. 1427–1440.
21. Teller K., Illner D., Thamm S., Casas-Delucchi C.S., Versteeg R., Indemans M., Cremer T., Cremer M. // *Nucleus*. 2011. V. 2. P. 465–477.
22. Meshorer E., Yellajoshula D., George E., Scambler P.J., Brown D.T., Misteli T. // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. P. 105–116.

УДК 577.21:579.873.21:579.258

Транскриптом *Mycobacterium tuberculosis* при заражении мышей с разной генетической чувствительностью к инфекции

Т. А. Скворцов^{1*}, Д. В. Игнатов¹, К. Б. Майоров², А. С. Апт², Т. Л. Ажикина¹¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

*E-mail: timofey@ibch.ru

Поступила в редакцию 18.12.2012

РЕФЕРАТ Изучение экспрессии генов с помощью массированного секвенирования в настоящее время находит широкое применение в различных областях биологии, включая микробиологию. В данной работе приведены результаты анализа полногеномной экспрессии *Mycobacterium tuberculosis* при персистенции в тканях легкого инфицированного хозяина. Мышей двух линий с генетически различной чувствительностью к туберкулезу инфицировали патогенными бактериями *M. tuberculosis*. Библиотеки кДНК микобактерий, полученные из инфицированных тканей, были подвергнуты массированному секвенированию и сравнительному анализу. Установлено, что структура транскриптома *M. tuberculosis* при развитии инфекции указывает на активизацию липидного метаболизма, метаболизма аминокислот, переход к анаэробному дыханию, повышение экспрессии факторов модуляции иммунного ответа. Важный результат нашей работы – выделение 209 генов, уровень экспрессии которых повышался в ходе развития инфекционного процесса в организмах хозяев обеих линий – Commonly Upregulated Genes (CUG). Наибольший интерес представляют гены, относящиеся к функциональным категориям липидного метаболизма и клеточной стенки, и клеточных процессов. Мы полагаем, что продукты этих генов необходимы *M. tuberculosis* для преодоления иммунного ответа организма хозяина и тем самым представляют потенциальные мишени для разработки лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Mycobacterium tuberculosis*, транскриптом *in vivo*, Commonly Upregulated Genes, RNA-seq, туберкулез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CC – клонирование идентичных последовательностей (Coincidence Cloning); CUG – Commonly Upregulated Genes; PDIM – димикоцерозат фтиоцерола (phthiocerol dimycocerosate).

ВВЕДЕНИЕ

Эксперименты, в ходе которых экспрессия организма изучается на полногеномном уровне, генерируют гигантские объемы информации и имеют практически безграничные возможности применения. К примеру, данные, полученные в подобных экспериментах, могут использоваться для оценки эффективности антибиотиков или изучения изменений бактериального метаболизма в ходе инфекционного процесса. Среди инфекций, вызываемых бактериальными патогенами, туберкулез занимает первое место по уровню смертности, унося каждый год около 1.5 млн жизней. Неудивительно, что первое исследование транскриптома его возбудителя, *Mycobacterium tuberculosis*, было проведено в течение года с момента опубликования полной нуклеотидной последовательности

генома этой бактерии [1, 2]. Уже через 5 лет появилось значительное число публикаций, описывающих результаты использования микроэрреев для транскриптомного анализа микобактерий в различных условиях [3, 4]. Тем не менее, хотя технологии микроэрреев и массированного секвенирования стали быстро применяться в микробиологических исследованиях, будучи адаптированы в том числе и к изучению полногеномной экспрессии микобактерий, большинство подобных работ выполнены *in vitro*. В то же время анализ экспрессии генов микобактерий в ходе развития инфекционного процесса *in vivo*, представляющий собой наибольший научный интерес, достаточно сложен [5, 6]. В данной работе мы описываем результаты изучения экспрессии генов *M. tuberculosis* в ходе модельного инфекционного процесса в мы-

шах двух линий, различающихся по чувствительности к туберкулезу. Так как различия в генотипе животных непосредственно влияют на экспрессию генов патогена, увеличение экспрессии ряда бактериальных генов в более неблагоприятных условиях (в организме хозяина, устойчивого к инфекции) указывает на важность этих генов для адаптации *M. tuberculosis* к защитным механизмам хозяина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модельная инфекция и выделение РНК

В качестве модельных организмов использовали мышей инбредных линий I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6YCit (B6), содержащихся в стандартных условиях в виварии ЦНИИТ РАМН в соответствии с положениями приказа Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 и NIH Office of Laboratory Animal Welfare Assurance № A5502-11. Корм и вода животным были доступны *ad libitum*. Все экспериментальные процедуры одобрены комитетом по биоэтике ЦНИИТ.

Самки мышей обеих линий в возрасте 2.5–3.0 мес. инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv с помощью системы аэрозольного заражения (Glas-Col, Terre Haute, США) из расчета 100–200 КОЕ на мыш. Инфицированные животные были умерщвлены через 4 и 6 нед. с момента заражения, после чего ткани легких немедленно использовали для выделения РНК. Суммарную РНК выделяли при помощи набора реактивов SV Total RNA Isolation System (Promega, США), после чего образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (MBI Fermentas, Литва) для удаления следовых количеств ДНК.

Синтез кДНК

кДНК синтезировали с использованием эффекта template-switch (Clontech, США) по методике [7]. кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы PowerScript II (Clontech, США) в условиях, рекомендованных фирмой-производителем. Олигонуклеотидные праймеры BR (5'-AAGCAGTGGTATC AACGCAGAGTAC(N)9) и SMART (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-ACGCrGrGrG) добавляли к 2 мкг суммарной РНК каждого из образцов в буферном растворе объемом 11 мкл. Полученную смесь инкубировали в течение 2 мин при 70°C, а затем помещали в лед на 10 мин. Во время нахождения на ледяной бане в смесь вносили 11 мкл раствора, содержащего 4 мкл 5×буфера для обратной транскриптазы, 2 мкл раствора 100 мМ DTT, 2 мкл раствора 10 мМ каждого dNTP, 1 мкл (200 ед. акт.) обратной транскриптазы PowerScript (Clontech, США). Параллельно с реакцией обрат-

ной транскрипции (RT+) проводили контрольную реакцию (RT-) без добавления обратной транскриптазы. Реакционные смеси RT+ и RT- инкубировали при 37°C в течение 10 мин, затем 40 мин при 42°C. Реакционные смеси инкубировали при 37°C (10 мин), затем при 42°C (120 мин). Параллельно с реакцией обратной транскрипции (RT+) проводили контрольную реакцию (RT-) без добавления обратной транскриптазы. Для препаративного синтеза кДНК проводили 30 циклов ПЦР (95°C, 20 с; 64°C, 20 с; 72°C, 2 мин) с использованием праймера 5S (5'-GTGGTATCAACGCAGAGT). Амплифицированную кДНК очищали набором реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, США).

Клонирование идентичных последовательностей

Идентичные последовательности (Coincidence Cloning) клонировали согласно [8]. Геномную ДНК *M. tuberculosis* H37Rv и образцы суммарных (т.е. синтезированных на матрицах суммарной РНК) кДНК фрагментировали эндонуклеазами рестрикции RsaI и AluI (MBI Fermentas, Литва). Полученные фрагменты геномной ДНК и кДНК лигировали с соответствующими супрессионными адаптерами (структуры адаптеров приведены в [7]). Смесь, содержащую 100 нг образца геномной ДНК с адаптерами и 100 нг соответствующего образца кДНК с адаптерами в 2 мкл гибридационного буфера НВ (50 мМ HEPES, pH 8.3; 0.5 М NaCl; 0.02 мМ EDTA, pH 8.0), инкубировали при 99°C в течение 5 мин (денатурация), а затем при 68°C в течение 18 ч (ренатурация). Затем в реакционную смесь добавляли 100 мкл предварительно нагретого до 68°C гибридационного буфера НВ. Полученный раствор (1 мкл) использовали для проведения двустадийной ПЦР-амплификации.

Первую стадию ПЦР осуществляли в реакционном объеме 25 мкл, содержащем 10 пмоль внешнего праймера Т7. После преинкубации в течение 5 мин при 72°C проводили 20 циклов амплификации (94°C, 30 с; 66°C, 30 с; 72°C, 90 с). Вторую стадию амплификации проводили с использованием внутренних праймеров (94°C, 30 с; 68°C, 30 с; 72°C, 90 с; 25 циклов) [7]. В качестве матрицы для второй стадии амплификации использовали амплификат первой стадии, разведенный в 10 раз. Амплификат второй стадии очищали с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, США) и использовали для массированного секвенирования.

Массированное секвенирование

Перед секвенированием одинаковые количества амплификатов различных продуктов Coincidence Cloning (по 500 нг каждого амплификата) объединяли

в один образец. Нуклеотидные последовательности определяли параллельным пиросеквенированием с помощью генетического анализатора GS FLX (454 Roche, Германия). Полученные последовательности (прочтения) проверяли на наличие в них последовательностей адаптеров. Прочтения с укороченными, неправильными или отсутствующими адаптерными последовательностями исключали из дальнейшего анализа. Оставшиеся последовательности (190031 прочтение) были разделены на три группы (библиотеки) в зависимости от нуклеотидной последовательности их адаптеров: CC4(RES) и CC6(RES), представляющие собой библиотеки кДНК из легких инфицированных мышей линии В6 (устойчивой к туберкулезу) на 4-й и 6-й нед. с момента заражения соответственно; CC6(SUS) – библиотеки кДНК из легких инфицированных мышей линии I/St (чувствительной к туберкулезу) на 6-й нед. с момента заражения. Файл в формате FASTA, содержащий нуклеотидные последовательности из всех трех групп, использовали для дальнейшей работы.

Файлы в формате FASTA могут быть предоставлены авторами по запросу.

Картирование последовательностей и статистический анализ

Полученные последовательности картировали на последовательность генома *M. tuberculosis* H37Rv (сборка GenBank AL123456.2) с помощью программы blastn, входящей в пакет программ NCBI BLAST+, со следующими параметрами: -perc identity 95 и -evalue 0.01. В результате были отобраны последовательности, имеющие не менее 95% идентичности всей длины с участками генома *M. tuberculosis* H37Rv. Все последовательности длиной менее 40 нуклеотидов были исключены из обработки. Из дальнейшего анализа исключили также последовательности, картируемые в геноме *M. tuberculosis* не уникально (в два места и более). Прочтения, картируемые на межгенные последовательности, из дальнейшего анализа не исключали, так как это изменило бы размеры библиотек и привело к ошибкам при последующем статистическом анализе. Затем для каждого гена и межгенного участка определяли количество прочтений в каждой библиотеке и проводили сравнительный анализ представленности фрагментов кДНК, соответствующих бактериальным генам и межгенным участкам при помощи алгоритма Audic-Claverie [9]. Различия в экспрессии генов (межгенных участков) признавали значительными, если количество прочтений, картируемых на ген (межгенный участок), по крайней мере в одной из двух сравниваемых библиотек, было не менее 20 и значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления особенностей профиля экспрессии *M. tuberculosis*, коррелирующих с прогрессией инфекции, на разных этапах инфекционного процесса мы провели сравнительный количественный и качественный анализ последовательностей, транскрибирующихся при заражении мышей, генетически чувствительных (неэффективный иммунный ответ) и резистентных (эффективный ответ) к этим бактериям.

Мы сравнили транскриптомы *M. tuberculosis* H37Rv при инфекции мышей двух линий, I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6YCit (B6). Эти линии мышей были подробно описаны ранее [10]. У мышей линии B6 устойчивость к *M. tuberculosis* выше, чем у мышей линии I/St, что выражается в менее агрессивном течении инфекционного процесса у мышей линии B6 и более длительной выживаемости инфицированных животных.

Самок мышей обеих линий спустя 4 и 6 нед. с момента аэрогенного заражения бактериями *M. tuberculosis* умерщвляли и выделяли из их легких суммарную РНК. Образцы суммарной РНК из тканей легкого мышей I/St и B6 использовали для синтеза кДНК, обогащенной впоследствии фрагментами бактериальной кДНК методом клонирования идентичных последовательностей [8]. Всего получили три библиотеки последовательностей, характеризующие транскриптомы *M. tuberculosis* из тканей мышей линии I/St на 6-й нед. с момента инфекции (CC6(SUS)) и из тканей мышей линии B6 на 4-й и 6-й нед. с момента инфекции (CC4(RES) и CC6(RES) соответственно). Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК из данных библиотек определяли с помощью массированного 454 пиросеквенирования. Общая схема эксперимента приведена на *рисунке*, общая характеристика проанализированных библиотек приведена в *табл. 1*. Всего определили нуклеотидные последовательности 190031 фрагмента кДНК. Из них в CC4(RES) определили 73410 последовательностей, 75655 – в образце CC6(SUS), 40966 – в CC6(RES). Полученные последовательности картировали на последовательность генома *M. tuberculosis* H37Rv (сборка GenBank AL123456.2) с помощью программы blastn из программного пакета NCBI BLAST+.

По результатам картирования было установлено, что в образце CC4(RES) 14990 (20.42%) последовательностей идентичны последовательностям *M. tuberculosis*, в образце CC6(SUS) – 43618 (57.65%) и в образце CC6(RES) – 34234 (83.57%). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что удалось достигнуть значительного обогащения образцов кДНК бактериальными последовательностями.

Из 4012 генов и семи псевдогенов *M. tuberculosis* в образце CC4(RES) экспрессировались 1012 (25.2%)

Таблица 1. Результаты секвенирования и картирования библиотек CC4(RES), CC6(RES) и CC6(SUS)

Библиотека	CC4(RES)	CC6(SUS)	CC6(RES)
Прочтений, всего	73410	75655	40966
Mtb-специфических прочтений, уникальных	14990	43618	34234
Mtb-специфических прочтений (уникальных), % от всех	20.4	57.7	83.6
Генов экспрессируется (прочтений > 0)	1012	1353	1940
Генов экспрессируется, % от общего количества генов	25.2	33.7	48.3
IGR экспрессируется (прочтений > 0)	164	221	376
IGR экспрессируется, от общего количества IGR, %	5.3	7.2	12.3

от общего количества генов), в образце CC6(SUS) – 1353 (33.7%), в образце CC6(RES) – 1940 генов (48.3%). Ни в одном из образцов не экспрессировались 1428 генов (35.5%), в то время как 469 (11.7%) генов экспрессировались в каждом из образцов.

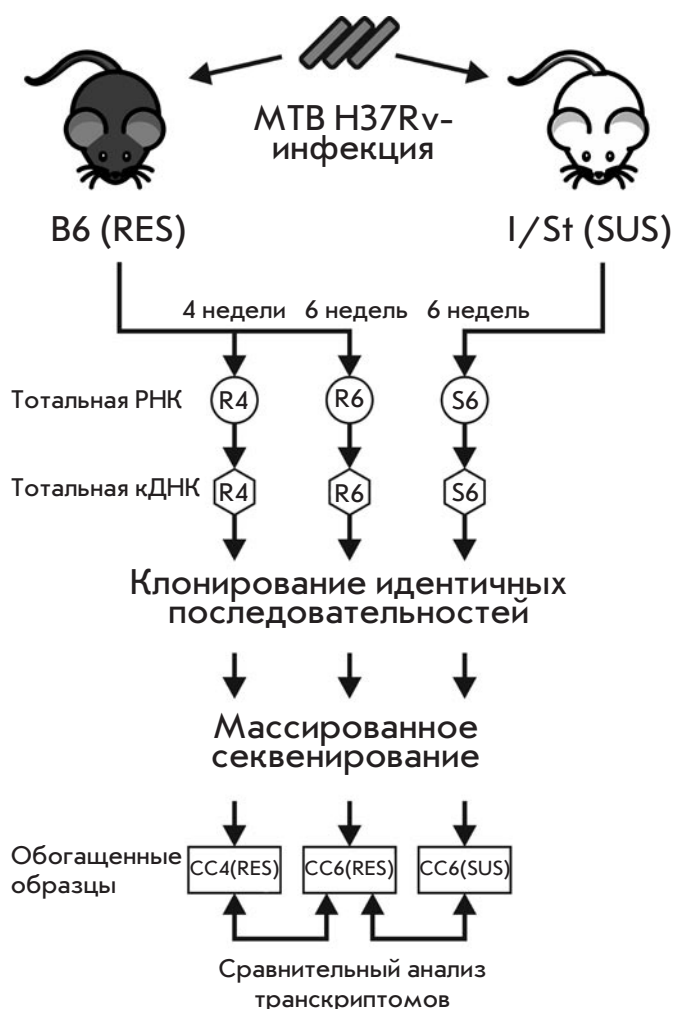
Некодирующие РНК

Новейшие исследования с применением технологий массивного секвенирования показали, что бактериальный транскриптом значительно более сложен, чем считалось ранее. Показано, что некодирующие РНК представляют значительную и важную часть транскриптома и регулируют различные клеточные функции, среди которых можно выделить репликацию, энергетический метаболизм и регуляцию экспрессии факторов вирулентности у ряда бактериальных патогенов [11].

Мы провели поиск транскриптов из локусов, расположенных в межгенных областях, так как подобная локализация свидетельствует о потенциальной принадлежности этих транскриптов к группе некодирующих РНК. На основании данных о структурной организации генома мы выделили 3069 межгенных областей. После анализа данных пиросеквенирования установили, что в образцах CC4(RES), CC6(SUS) и CC6(RES) присутствовали 164 (5.3%), 221 (7.2%) и 376 (12.3%) транскриптов межгенных областей соответственно. При этом транскрипты из 27 (0.9%) локусов были представлены в каждом из трех образцов, и ни разу не встретились транскрипты 2490 (81.1%) локусов.

Данные об экспрессии межгенных областей, полученные в ходе эксперимента, сопоставили с опубликованной и представленной в базах данных информацией о локализации генов малых РНК.

Мы выявили значительный уровень экспрессии последовательностей из ряда межгенных участ-



Общая схема эксперимента по сравнению транскриптомов *M. tuberculosis*. RES – генетически устойчивая линия мышей; SUS – генетически чувствительная линия мышей; CC – библиотека, обогащенная бактериальной кДНК

ков, в частности из IGR3987 и IGR0629, в образце CC6(SUS) и из IGR1186 в образце CC6(RES). Результаты нашего эксперимента показали также экспрессию из межгенных участков IGR3987, IGR0629 и IG1136, что коррелирует с данными, полученными Arnvig et al. [12] (согласно обозначениям, используемым в [12], – межгенные участки IGR2975, IGR0479 и IGR0858 соответственно). Мы полагаем, что обнаруженная нами экспрессия межгенных последовательностей может свидетельствовать о потенциальной локализации в данных локусах генов малых РНК и, принимая во внимание их дифференциальную экспрессию, может быть отражением компенсаторной реакции патогена на воздействия внешней среды.

Гены, экспрессия которых повышается при развитии инфекции

Мы сравнили транскриптом при развитии инфекции в генетически устойчивой линии мышей (CC6(RES) и CC4(RES)) и в одной временной точке в генетически различных линиях мышей (CC6(RES) и CC6(SUS)). Целью этого сравнения был поиск генов, экспрессия которых повышается при развитии инфекции, т.е. в мышцах линии В6 на 6-й нед. после заражения по сравнению с другими точками. Сравнение CC6(RES) и CC4(RES) позволило нам выявить 226 генов, экспрессия которых повышена в ходе развития инфекции в тканях мышей В6. В результате сравнения CC6(RES) и CC6(SUS) обнаружили 253 гена, экспрессия которых повышена в образце CC6(RES).

Сравнение CC6(RES) и CC4(RES) позволило выявить только 17 генов, экспрессия которых в CC6(RES) выше, чем в CC4(RES), тогда как экспрессия 44 генов в CC6(RES) была выше, чем в CC6(SUS). Вероятно, эти результаты отражают тот факт, что первое сравнение характеризует динамику изменения экспрессии генов патогена во времени в пределах одного микроокружения. Во втором случае выявляются различия между двумя разными микроокружениями, что отражается в большем количестве генов, экспрессия которых повышена в CC6(RES).

Гены, экспрессия которых в образце CC6(RES) повышена только по сравнению с CC4(RES), относятся преимущественно к категориям cell wall and cell processes, intermediary metabolism and respiration и lipid metabolism. Белковые продукты 12 из 17 генов обнаружены во фракции клеточной мембраны и/или клеточной стенки, где они выполняют преимущественно транспортные и защитные функции. Так, ген *embA* кодирует индолилацетилинотол-арабинозилтрансферазу EmbA, участвующую в синтезе арабиана. Мутации в этом гене приводят к устойчивости к этамбутолу. Ген *Rv3273* кодирует карбонатдегидратазу, функции которой связа-

ны с транспортом сульфатов (TubercuList). Анализ с использованием баз данных KEGG Pathways (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) и TBCYC (<http://tbcyc.tdbb.org/>) не выявил метаболических путей, которые активируются на более поздних стадиях развития инфекции. Этот факт может быть либо следствием случайных флуктуаций в экспрессии генов патогена, его реакцией на случайные изменения свойств микроокружения, либо отражать небольшие, но существенные различия функциональной активности *M. tuberculosis* в различных временных точках.

Сравнение образцов CC6(RES) и CC6(SUS) обнаружило в CC6(RES) больше генов, экспрессия которых в этом образце была выше, чем в CC6(SUS). Усиление энергетического обмена выражалось в повышенной экспрессии генов трех субъединиц NADH-дегидрогеназы (*nuoH*, *nuoI*, *nuoL*); большей активности цикла трикарбоновых кислот (*acn*), а также в повышенной экспрессии гена *Rv1916*. Ген *Rv1916* является второй частью гена *aceA* (*icl2*), разделенного у *M. tuberculosis* H37Rv на два модуля, *Rv1915* и *Rv1916* (*aceAa* и *aceAb*), которые экспрессируются по отдельности. Среди других важных отличий можно отметить также повышенную экспрессию генов, продукты которых отвечают за метаболизм и катаболизм липидов и аминокислот (*lipV*, *lipF*, *Rv2531c*), а также ферментов, участвующих в репарации ДНК (*recO*, *recB*). Подобная картина достаточно предсказуема, так как микроокружение резистентного хозяина представляет собой враждебную среду обитания, что объясняет необходимость большей активности систем репарации. Повышенная экспрессия липолитических ферментов (*lipF*, *lipV*, *plcA*), ферментов цикла трикарбоновых кислот и *aceAb* могут указывать на большую степень использования липидов в качестве источника энергии и углерода.

Мы сосредоточились на поиске генов *M. tuberculosis*, повышенная экспрессия которых не зависит от генетических особенностей организма-хозяина. Эти гены образуют некий базовый набор, отражающий универсальную компенсаторную реакцию патогена на неблагоприятные условия окружающей среды. Далее эти гены обозначены как CUG – Commonly Upregulated Genes. Определено 209 генов, экспрессия которых увеличена в обоих сравнениях (табл. 2). Согласно результатам транспозонного мутагенеза 44 гена *M. tuberculosis* H37Rv относятся к незаменимым (essential, [13]); необходимость еще трех генов (*Rv3569c*, *Rv3537*, *Rv3563*) для выживания в макрофагах мыши показана ранее (TubercuList, <http://tuberculist.epfl.ch>).

Мы сформировали группы генов CUG по их принадлежности к функциональным категориям (Tu-

Таблица 2. Гены группы CUG

Ген	Функциональная категория (согласно TubercuList)
<i>Rv0028, Rv0074, Rv0269c, Rv0274, Rv0281, Rv0421c, Rv0428c, Rv0433, Rv0448c, Rv0455c, Rv0492A, Rv0525, Rv0597c, Rv0695, Rv1179c, Rv1186c, Rv1203c, Rv1232c, Rv1419, Rv1428c, Rv1828, Rv1835c, Rv1868, Rv1998c, yfiH, Rv2974c, Rv3030, Rv3031, Rv3205c, Rv3272, Rv3519, Rv3627c, Rv3651, Rv3662c, Rv3703c, Rv3753c, Rv0026, Rv0061, Rv0140, Rv0141c, Rv0145, Rv0332, Rv0712, Rv0785, Rv0998, Rv1514c, Rv1515c, wbbL2, Rv1760, Rv2077A, Rv2135c, Rv2466c, Rv2699c, Rv2751, Rv2823c, Rv3067, Rv3090, Rv3094c, Rv3510c</i>	CH – conserved hypotheticals
<i>Rv0051, Rv0309, lprL, Rv0621, Rv0876c, lytB2, irtA, Rv1687c, secA2, Rv2209, Rv2265, mmpL7, Rv3194c, Rv3658c, embC, espE, ponA1, Rv0072, narK3, iniA, cpsY, lpqR, pstS1, Rv0996, kdpC, Rv1097c, sugB, Rv1431, Rv1667c, Rv2136c, Rv2203, efpA, rip, Rv2963, lpqF</i>	CWaCP – cell wall and cell processes
<i>Rv0161, ndhA, Rv0526, menH, Rv0805, lipU, glyA1, dapE, atpF, atpH, Rv1432, frdB, cmk, plcD, lipJ, cobK, cobS, cysK1, cysE, gdh, gabT, miaA, ilvC, guaB2, cyp142, hsaD, Rv0089, Rv0331, aspC, hemA, Rv0567, atsA, gltA2, Rv0943c, Rv1096, Rv1106c, narH, thrB, hisB, ilvG, rocD1, plcB, phoH1, ggtB, lepA, Rv2499c, dapF, purU, kstD, folP1</i>	IMaR – intermediary metabolism and respiration
<i>end, fusA1, polA, lysX, helZ, spoU, ppiB, thrS, Rv3201c</i>	IP – information pathway
<i>Rv0095c, Rv0920c, Rv2791c</i>	ISaP – insertion sequences and phages
<i>fadD10, nrp, fadD7, fadE4, fadD2, fadD12, pks17, pks12, mbtF, mbtE, mbtC, TB7.3, accA3, fadE27, fadD17, accD4, mmaA3, mmaA1, fadE19, Rv2613c, fadD26, ppsC, ppsD, fadD19, fadE31, fadE32, pks13</i>	LM – lipid metabolism
<i>PPE8, PE_PGRS19, PE16, PPE34, PPE50, PE2, PPE64</i>	PE/PPE – PE/PPE protein families
<i>pknA, senX3, trcR, Rv1359, fhaA, Rv0465c, Rv3066, Rv3736</i>	RP – regulatory proteins
<i>Rv2645, Rv2818c</i>	U – unknown
<i>treS, mce2C, Rv1026, ephB, vapB16, Rv2581c, vapC3, cinA, virS</i>	VDA – virulence, detoxification, adaptation

bercuList) и сравнили их распределение с распределением всех генов *M. tuberculosis*. В целом эти распределения оказались сходными, за исключением генов категории липидного метаболизма, что может свидетельствовать в пользу их важности в процессах бактериальной адаптации.

Чуть меньше трети генов приходилось на две категории – conserved hypotheticals (59 генов) и unknown (два гена). Несмотря на отсутствие известных функций, гены данной категории представляют потенциальные терапевтические мишени, так как невысокая степень их гомологии с генами других микроорганизмов означает, что они характерны именно для микобактерий или конкретно для *M. tuberculosis*, определяя, возможно, вирулентные свойства.

В пользу того, что микобактерии оказываются в бедных питательными веществами условиях, указывает высокий уровень экспрессии генов различных систем захвата и накопления питательных веществ, например, фосфата (*pstS1*), железа (*irtA, mbtC, mbtE, mbtF*). На нехватку фосфата указывает и повышенная экспрессия гена *senX3*, сенсорного компонента двухкомпонентной регуляторной системы *senX3/regX3*, активирующей так называемый «строгий ответ» (stringent response) в условиях дефици-

та фосфата. На переход к использованию в качестве основного источника энергии и углерода указывает экспрессия генов метаболизма липидов (*fadD, fadE, lipU, lipJ*). Еще одна особенность генов группы CUG – повышенная экспрессия генов, продукты которых тем или иным образом связаны с метаболизмом аминокислот (*aspC, hisB, thrB, thrS*). Причина подобного явления не вполне ясна, так как стимуляция экспрессии ферментов может быть вызвана как отсутствием необходимых аминокислот (и соответственно необходимостью их синтеза), так и их наличием (и возможностью для бактерии использовать их).

На переход к характерному для латентной инфекции анаэробному нитратному дыханию указывает повышенная экспрессия генов *narH* и *narK3* [14]. К генам группы CUG мы отнесли также гены *atpF* и *atpH*, хотя обычно сообщают о снижении их экспрессии при развитии инфекции, так как энергетические потребности патогена снижаются по мере того, как он входит в состояние латентной инфекции [15, 16].

Функция белков семейства PE/PPE не вполне понятна. Считается, что они необходимы для создания антигенной вариабельности у микобактерий [17]. Тем не менее гены *Rv0152c* и *Rv0355c* экспрессируются на высоком уровне в образце CC6(RES), и их экспрес-

сия обнаружена в образцах CC4(RES) и CC6(SUS), а ген *Rv3135* относится к числу незаменимых у *M. tuberculosis* H37Rv, что может указывать на какие-либо дополнительные функции, помимо обеспечения антигенной вариабельности.

Наконец, стоит отметить ген *secA2*. Этот ген кодирует транслоказу SecA2 – компонент вспомогательной транспортной системы Sec *M. tuberculosis*, обеспечивающей, помимо прочего, секрецию супероксиддисмутазы SodA и каталазы KatG. Живая вакцина, созданная на основе мутанта *M. tuberculosis* по гену *secA2*, показала высокую эффективность и безопасность при испытаниях на животных [18].

Недавно методом микроэрреев провели сравнительный анализ профилей экспрессии 17 представителей комплекса *M. tuberculosis* в активированных и неактивированных макрофагах мыши [19]. В результате удалось выделить 280 генов (168 с универсально повышенной и 112 с универсально пониженной экспрессией), изменение экспрессии которых не зависело от штамма и статуса активации макрофага. Мы сравнили гены группы CUG со 168 генами с универсально повышенной экспрессией, взятыми из работы [19], и выделили восемь (*Rv0140*, *Rv0145*, *atsA*, *Rv2466c*, *fadD26*, *ilvC*, *Rv3067* и *kstD*), представленных в обоих списках. Столь небольшое совпадение можно объяснить тем, что а) инфекция макрофагов в культуре представляет собой достаточно упрощенную модель по сравнению со сложными взаимоотношениями между клетками-хозяина и патогена в ходе инфекционного процесса в организме-хозяина и б) результаты анализа экспрессии с помощью микроэрреев могут достаточно сильно отличаться от результатов, полученных с помощью массивированного секвенирования. К примеру, Ward et al. [20] пишут о расхождении результатов, полученных этими двумя методами.

Тем не менее расхождения в результатах, полученных нами и Homolka et al. [19], не являются кардинальными. Функциональный анализ генов с повышенной экспрессией показал, что они ассоциированы с такими внутриклеточными стрессовыми воздействиями, как гипоксия, действие активных форм кислорода и азота, ремоделирование клеточной стенки и метаболизм жирных кислот. В качестве примера можно указать гены, ассоциированные с нехваткой железа (гены кластера *mtbA-F*), а также гены, вовлеченные в биосинтез валина и изолейцина (*ilvB-ilvN-ilvC*) и димикоцерозатов фтиоцерола (PDIM) клеточной стенки (*ppsA-D*).

Продукты генов группы CUG как потенциальные терапевтические мишени

После анализа доступной научной литературы и баз данных было выделено шесть генов, представляющих

собой потенциальные или уже предложенные лекарственные мишени. Продукты этих генов (*hisB*, *aspC*, *PPE50*, *Rv1026*, *ilvC* и *Rv1186c*) упомянуты как точки, привлекательные для терапевтического воздействия, так как нарушения их функциональной активности оказывали максимальный дестабилизирующий эффект на метаболизм *M. tuberculosis*. К примеру, аспартат-аминотрансфераза AspC, кодируемая геном *aspC* (*Rv0337c*), в метаболической сети микобактериальной клетки идентифицирована как фермент, инактивация которого влияла на большое число других белков *M. tuberculosis* и тем самым эффективно разрушала большое число биохимических циклов [21]. Белковые продукты двух других генов, *Rv1186c* и *PPE50* (*Rv3135*), вошли в список наиболее привлекательных потенциальных терапевтических мишеней, составленный на основе многочисленных данных об экспрессии, вовлеченности в различные метаболические пути и структурной гомологии с белками других бактерий и человека [22]. Гены *Rv1026*, *hisB* (*Rv1601*) и *Rv3001c*, как полагают [23], кодируют продукты, пригодные для создания специфических ингибиторов. Белок, кодируемый геном *Rv1601* (*hisB*), независимо рассматривается в качестве потенциальной терапевтической мишени [24]. Стоит отметить, что экспрессия гена *Rv1026*, кодирующего пирофосфатазу, повышена в макрофагах и легких инфицированных мышей [25, 26], а также в условиях ингибирования трансляции у микобактерий [27]. Недавно показали, что недостаток полифосфатов, обусловленный гидролитической активностью *Rv1026*, может приводить к изменению содержания жирных кислот в клеточной стенке *M. smegmatis*, влияя тем самым на способность к перемещению (sliding motility) и образованию биопленок [28]. Таким образом, можно ожидать, что и продукты остальных генов группы CUG могут быть использованы для создания лекарственных средств или диагностики туберкулеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционные заболевания, вызываемые внутриклеточными патогенными бактериями, представляют собой серьезную медицинскую проблему. Ход инфекционного процесса зависит не только от защитных механизмов хозяина, но и от специфической экспрессии бактериальных генов. Изменения экспрессии генов в ответ на различные реакции иммунной системы хозяина необходимы для выживания и размножения патогенных бактерий. Изучение изменений профиля транскрипции *M. tuberculosis* под воздействием различных стимулов и условий внешней среды позволяет описать адаптационные механизмы, необходимые бактерии для эффективного заражения организма-хозяина.

Изучение профилей транскрипции *M. tuberculosis* в различных условиях позволило выявить базовый набор генов (CUG), экспрессия которых повышается в ходе развития инфекции и не зависит от генетических особенностей организма-хозяина. Экспрессия генов из этого ряда может рассматриваться как универсальная реакция микобактерий на различные стрессовые факторы внешней среды. Накопление и анализ данных об экспрессии генов *M. tuberculosis* позволит значи-

тельно упростить разработку эффективных подходов к диагностике и лечению туберкулеза. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8308); РФФИ (грант № 11-04-01325); Программой поддержки ведущих научных школ России (проект НШ-1674.2012.4); Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, et al. // *Nature*. 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
- Wilson M., DeRisi J., Kristensen H.H., Imboden P., Rane S., Brown P.O., Schoolnik G.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 22. P. 12833–12838.
- Butcher P.D. // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2004. V. 84. № 3–4. P. 131–137.
- Kendall S.L., Rison S.C., Movahedzadeh F., Frita R., Stoker N.G. // *Trends Microbiol.* 2004. V. 12. № 12. P. 537–544.
- Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л. // *Биоорган. химия*. 2010. Т. 36. № 5. С. 596–606.
- Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л. // *Биоорган. химия*. 2012. Т. 38. № 4. С. 391–405.
- Игнатов Д.В., Скворцов Т.А., Майоров К.Б., Апт А.С., Ажикина Т.Л. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 3 (6). С. 57–62.
- Azhikina T.L., Skvortsov T.A., Radaeva T.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Apt A.S., Sverdlov E.D. // *Biotechniques*. 2010. V. 48. № 2. P. 139–144.
- Audic S., Claverie J.M. // *Genome Res*. 1997. V. 7. № 10. P. 986–995.
- Kondratieva E., Logunova N., Majorov K., Averbakh M., Apt A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 5. P. e10515.
- Arnvig K., Young D. // *RNA Biology*. 2012. V. 9. № 4. P. 427–436.
- Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T.T., Parkhill J., Dougan G., et al. // *PLoS Pathog*. 2011. V. 7. № 11. P. e1002342.
- Sassetti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 1. P. 77–84.
- Shi L., Sohaskey C.D., Kana B.D., Dawes S., North R.J., Mizrahi V., Gennaro M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 43. P. 15629–15634.
- Stokes R.W., Waddell S.J. // *Future Microbiol.* 2009. V. 4. № 10. P. 1317–1335.
- Waddell S.J. // *Drug Discov. Today: Dis. Mech.* 2010. V. 7. № 1. P. e67–e73.
- Karboul A., Mazza A., Gey van Pittius N.C., Ho J.L., Brousseau R., Mardassi H. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 23. P. 7838–7846.
- Hinchey J., Jeon B.Y., Alley H., Chen B., Goldberg M., Derrick S., Morris S., Jacobs W.R., Jr., Porcelli S.A., Lee S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. P. e15857.
- Homolka S., Niemann S., Russell D.G., Rohde K.H. // *PLoS Pathog*. 2010. V. 6. № 7. P. e1000988.
- Ward S.K., Abomoelak B., Marcus S., Talaat A.M. // *Front. Microbiol.* 2010. V. 1. P. 121.
- Raman K., Vashisht R., Chandra N. // *Mol. BioSystems*. 2009. V. 5. № 12. P. 1740–1751.
- Raman K., Yeturu K., Chandra N. // *BMC Systems Biol.* 2008. V. 2. № 1. P. 109.
- Kalapanulak S. High quality genome-scale metabolic network reconstruction of mycobacterium tuberculosis and comparison with human metabolic network: application for drug targets identification. Edinburgh: Univ. of Edinburgh, 2009.
- Nisa S.Y. ParA: a novel target for anti-tubercular drug discovery. Wellington: Victoria Univ. of Wellington, 2010.
- Srivastava V., Jain A., Srivastava B.S., Srivastava R. // *Tuberculosis*. 2008. V. 88. № 3. P. 171–177.
- Srivastava V., Rouanet C., Srivastava R., Ramalingam B., Loch C., Srivastava B.S. // *Microbiology*. 2007. V. 153. № 3. P. 659–666.
- Boshoff H.I.M., Myers T.G., Copp B.R., McNeil M.R., Wilson M.A., Barry C.E. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 38. P. 40174–40184.
- Shi T., Fu T., Xie J. // *Curr. Microbiology*. 2011. V. 63. № 5. P. 470–476.

УДК 577.113.4

Особенности регуляции экспрессии генов в системе рестрикции–модификации Ecl18kI

О. Ю. Буренина¹, Е. А. Федотова¹, А. Ю. Рязанова², А. С. Проценко³, М. В. Захарова³,
А. С. Карягина^{2,4,5}, А. С. Солонин³, Т. С. Орецкая^{1,2}, Е. А. Кубарева^{2*}

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

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, 142290, Пущино, просп. Науки, 5

⁴НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

⁵ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

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

Поступила в редакцию 29.11.2012

РЕФЕРАТ Регуляция транскрипции в бактериальных системах рестрикции–модификации (Р–М) является важным процессом, обеспечивающим согласованную экспрессию тандема ферментов – ДНК-метилтрансферазы (МТазы) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), защищающих клетку от проникновения чужеродной ДНК. В данной работе исследовали С5-цитозиную МТазу Ecl18kI (M.Ecl18kI), по структуре и свойствам практически идентичную МТазе SsoII (M.SsoII). Обе МТазы ингибируют экспрессию собственного гена и активируют экспрессию гена сопряженной ЭР, связываясь с регуляторным участком в промоторной области этих генов. Нами изучено комплексообразование M.Ecl18kI и РНК-полимеразы *Escherichia coli* с промоторными областями генов МТазы и ЭР, детализирован механизм регуляции экспрессии генов в системе Р–М Ecl18kI. Показано, что M.Ecl18kI конкурирует с РНК-полимеразой за связывание с промоторным участком, однако непосредственных контактов между M.Ecl18kI и РНК-полимеразой не выявлено. Изучены свойства мутантных форм M.Ecl18kI и M.SsoII. Установлено, что аминокислотные замены в N-концевой области M.Ecl18kI, выполняющей регуляторную функцию, влияют не только на способность этого белка взаимодействовать с регуляторным участком и выступать в роли фактора транскрипции, но и на его способность связывать и метилировать ДНК-субстрат. Потеря МТазой метилирующей активности не препятствует регуляции этим белком транскрипции генов в системе Р–М Ecl18kI и даже усиливает сродство к регуляторному участку. Однако наличие в молекуле M.Ecl18kI домена, ответственного за метилирование, необходимо для выполнения регуляторной функции M.Ecl18kI.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА системы рестрикции–модификации, С5-цитозиная ДНК-метилтрансфераза, ДНК-белковые взаимодействия, регуляция транскрипции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МТазы – ДНК-метилтрансфераза; ПААГ – полиакриламидный гель; РНКП – РНК-полимераза; система Р–М – система рестрикции–модификации; ЭР – эндонуклеаза рестрикции; AdoMet – S-аденозил-L-метионин; M.Ecl18kI – ДНК-метилтрансфераза Ecl18kI; M.SsoII – ДНК-метилтрансфераза SsoII. Префикс «d» при обозначении дезоксирибонуклеозидов, олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

ВВЕДЕНИЕ

Системы рестрикции–модификации (Р–М) широко распространены в бактериальных клетках, они содержат гены, кодирующие эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и ДНК-метилтрансферазы (МТазы). ЭР гидролизует определенную последовательность

в двухцепочечной ДНК (дцДНК), в то время как МТазы метилирует эту же последовательность в строго определенном месте, предотвращая тем самым ее расщепление ЭР. Система Р–М выполняет функцию примитивной иммунной системы, защищающей бактерию-хозяина от проникновения чужеродной

ДНК: ЭР гидролизует вторгающуюся ДНК, не метилированную должным образом соответствующей МТазой [1]. Уровень активности ЭР и МТазы в клетке должен быть строго скоординирован. Слишком низкий уровень экспрессии гена МТазы по сравнению с геном ЭР приводит к гибели клетки в результате гидролиза клеточной ДНК, а слишком высокий не может обеспечить клетке защиту при проникновении чужеродной ДНК.

Хотя наличие регуляции экспрессии генов в системах Р–М очевидно, механизмы этого процесса практически не изучены. Проведенные в последнее время исследования показали, что скоординированная экспрессия генов в системах Р–М определяется, по-видимому, регуляцией на уровне транскрипции. Выделяют три основных типа подобной регуляции: посредством С-белков (от англ. «control»), метилированием промоторной области системы Р–М МТазой, а также посредством взаимодействия МТазы с регуляторными участками ДНК, отличными от участка метилирования [2]. Последний тип регуляции характерен для С5-цитозинового МТаз (ферментов, метилирующих остаток цитозина в 5-м положении) из систем Р–М типа II и является предметом нашего исследования. На настоящий момент охарактеризовано более 300 С5-цитозинового МТаз (С5-МТаз), но существование регуляторной функции экспериментально подтверждено только у шести из них (М.МspI, М.ЕcoRII, М.ScrFIA, М1.LlaJI, М.SsoII и М.Еcl18kI) [2].

Наиболее хорошо изучена система Р–М типа II SsoII. Гены этой системы расположены в природной плазмиде Р4 (4250 п.н.) штамма *Shigella sonnei* 47, они направлены дивергентно, межгенная область составляет 109 п.н. [3]. Описаны еще четыре SsoII-подобные системы Р–М, выделенные из различных бактериальных штаммов, МТазы которых либо идентичны М.SsoII по аминокислотной последовательности (М.Kpn2kI из *Klebsiella pneumoniae* 2k), либо имеют незначительные отличия. Так, МТазы Ecl18kI из *Enterobacter cloacae* 18k и StyD4I из *Salmonella typhi* D4 содержат в позиции 56 Met вместо Ile, а МТаза SenPI из *Salmonella enteritidis* P1 содержит не только Ile56, но и Gly в позиции 11 вместо Glu [4–7]. Нуклеотидные последовательности соответствующих генов идентичны на 99–100%, а межгенных областей – на 100%. Поэтому данные о функционировании ферментов одной из этих систем могут быть распространены на остальные.

Все SsoII-подобные системы Р–М узнают в дцДНК последовательность 5'-CCNGG-3'/3'-GGNCC-5' (N = A, G, C или T) и в присутствии кофактора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) метилируют внутренний остаток C в этой последовательности

с образованием 5-метил-2'-дезоксцитидина [4]. На примере системы Ecl18kI определены промоторные элементы генов, кодирующих ЭР и МТазу SsoII-подобных систем Р–М [8], а также показана *in vitro* регуляция транскрипции этих генов посредством М.Ecl18kI. Для регуляции транскрипции М.Ecl18kI связывается с так называемым регуляторным участком – 15-звенным инвертированным повтором 5'-GGACAAATTGTCCT-3'/3'-CCTGTTTAACAGGA-5', локализованным внутри промоторной области генов системы Р–М Ecl18kI [9]. В регуляторном участке расположены нуклеотиды, участвующие в формировании специфических ДНК-белковых контактов с МТазой (рис. 1) [10, 11]. Все SsoII-подобные МТазы являются двухдоменными белками, N-концевая область (1–71 а.о.) которых обеспечивает регуляцию транскрипции, а участок 72–379 а.о. отвечает за функцию метилирования ДНК. Показано, что у М.SsoII N-концевая область имеет ярко выраженную вторичную структуру [12], в которой с высокой степенью вероятности предсказывается структурный модуль «спираль–поворот–спираль» (СПС). С регуляторным участком взаимодействуют две молекулы М.SsoII, мономерной в апо-форме [12]. На рис. 1 обобщены данные из работы [13] о предполагаемых контактах в комплексе N-концевой области М.SsoII с регуляторным участком ДНК.

Для детализации механизма регуляции транскрипции генов в SsoII-подобных системах Р–М в данной работе оценена эффективность комплексообразования

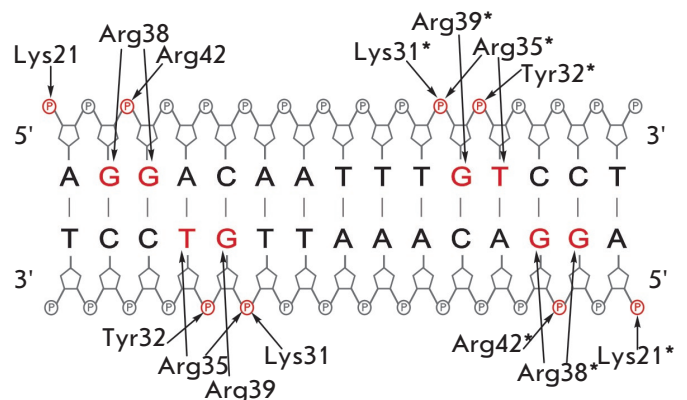


Рис. 1. Схема контактов аминокислотных остатков димера N-концевой области М.SsoII с регуляторным участком ДНК. Гетероциклические основания и фосфатные группы, идентифицированные методом футпринтинга как вовлеченные во взаимодействие с М.SsoII, выделены красным цветом. Аминокислотные остатки второй субъединицы М.SsoII отмечены звездочкой

зования M.Ecl18kI и РНК-полимеразы (РНКП) *E. coli* с фрагментами ДНК, содержащими регуляторные элементы генов системы Р-М Ecl18kI. Все известные SsoII-подобные системы Р-М выделены из различных штаммов энтеробактерий, к которым относится и *E. coli*, поэтому использование РНКП *E. coli* вполне оправдано. Впервые изучено значение остатков Lys21, Lys31, Lys46 и Lys53 в N-концевой области M.Ecl18kI для связывания этого белка с регуляторным участком, а также их влияние на способность МТазы действовать в качестве фактора транскрипции и на взаимодействие фермента с участком метилирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение белков

МТазу Ecl18kI и ее мутантные формы выделяли с помощью аффинной хроматографии на Ni-НТА-агарозе [4]. РНК-полимеразу *E. coli* выделяли последовательно аффинной хроматографией на Ni-НТА-агарозе и гепарин-сефарозе, а затем ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [14].

Синтез ДНК-фрагментов I–III

Фрагменты I–III синтезировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf North America, США). ДНК-фрагмент I получали с использованием праймеров 5'-TTGAGTCAATGAAGTCTTTCTC-3' и 5'-AGCAAATGGCGTAATAAAATGC-3'; ДНК-фрагмент II – 5'-TCATGCATGTCTACCCAGAA-3' и 5'-САТААААААТАААСТТТТАТАСТ-3', ДНК-фрагмент III – 5'-TTGAGTCAATGAAGTCT-3' и 5'-ССААСАСТТААТТСТГГ-3'. Температура гибридизации («отжига») для каждой пары праймеров составляла 62, 54 и 46°C соответственно. Цикл ПЦР (90°C – 60 с, отжиг праймеров – 60 с, 72°C – 40 с) повторяли 25 раз. После ПЦР ДНК осаждали этанолом (2.5 объема) в присутствии 1 М NaCl. Целевые ДНК выделяли из агарозного геля с использованием микроцентрифужных пробирок Spin-X Centrifuge Tube Filters (Costar, США).

Равновесное связывание белков с ДНК-лигандами

Радиоактивную метку вводили на 5'-конец олигонуклеотидов с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (10 ед. акт., Fermentas, Литва) и [γ -³²P]АТР. Комплексообразование M.Ecl18kI с фрагментами ДНК I–II и РНКП с фрагментами ДНК I–III проводили в 10 мкл буфера для связывания (50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол) в присутствии эквимольного белка количества гепарина в течение 40 мин при 37°C. В случае M.Ecl18kI реакционная

смесь содержала 1 мМ AdoMet. ДНК-белковый комплекс и свободный ДНК-дуплекс разделяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле. После электрофореза агарозные гели высушивали на подложке при температуре 90°C в токе горячего воздуха. Константы диссоциации (K_d) ДНК-белковых комплексов определяли методом Скэтчарда [15]. Концентрации M.Ecl18kI и РНКП составляли 60 и 30 нМ соответственно. Концентрации ДНК-дуплекса II варьировали в интервале от 5 до 120 нМ. Комплексообразование мутантных форм M.Ecl18kI(K46A), M.Ecl18kI(K53A) и M.Ecl18kI(K21A) с ДНК-фрагментами IV и V проводили в 20 мкл буфера для связывания (50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 50 нг/мкл poly(dI-dC)) в течение 20 мин при 37°C. Концентрации ДНК-дуплексов IV и V варьировали в интервале от 20 до 100 нМ. Концентрации M.Ecl18kI(K46A), M.Ecl18kI(K53A) и M.Ecl18kI(K21A) при связывании с ДНК-фрагментом IV составляли 560, 400 и 400 нМ соответственно, а при связывании с ДНК-фрагментом V – 200, 1600 и 5600 нМ соответственно.

Определение начальной скорости метилирования ДНК-субстрата

Начальную скорость метилирования ДНК-субстрата МТазами Ecl18kI, SsoII и их мутантными формами определяли как описано ранее [9], исходя из степени «защиты» дуплекса V от гидролиза ЭР Ecl18kI. С этой целью 350 нМ радиоактивно меченного ДНК-дуплекса V инкубировали с МТазой в буфере для связывания, содержащем 1 мМ AdoMet, в течение 0.5–60 мин при 37°C. Затем реакционную смесь выдерживали 10 мин при 65°C для инактивации фермента, охлаждали до 25°C, добавляли MgCl₂ (концентрация в реакционной смеси 10 мМ) и ЭР Ecl18kI (240 нМ) и инкубировали 1 ч при 37°C. Использовали одинаковую начальную активную концентрацию МТаз, равную 14 нМ. Степень гидролиза неметилированного ДНК-дуплекса V эндонуклеазой рестрикции Ecl18kI принимали за 100%. Степень метилирования ДНК-дуплекса V исследуемыми белками рассчитывали относительно этого значения и строили кинетические кривые. Начальные скорости метилирования (v_0) ДНК-дуплекса V МТазами рассчитывали как угловой коэффициент (тангенс угла наклона) начального прямолинейного участка кинетической кривой.

Транскрипция *in vitro*

Очищенный ДНК-фрагмент I (0.25 мкг) инкубировали с РНКП (3 пмоль) в буфере для транскрипции (40 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидин) в объеме 8 мкл в течение 10 мин при температуре 37°C, добавляли 2 мкл

водного раствора гепарина (0.25 мкг/мкл) и инкубировали еще 10 мин при температуре 37°C. Затем добавляли 10 мкл смеси из четырех рибонуклеозидтрифосфатов: УТР (12 мкМ), АТР, ГТР, СТР (500 мкМ каждого), содержащей 0.5 мкКи [α -³²P]УТР и 24 ед. акт. ингибитора РНКаз RiboLock (Fermentas, Литва) и инкубировали 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 10 мкл раствора для нанесения на гель RNA Loading Dye (Fermentas, Литва).

Характеристика регуляторной активности метилтрансфераз

Регуляторную активность мутантных форм M.Ecl18kI и M.SsoII оценивали, проводя транскрипцию *in vitro* с ДНК-фрагмента I в присутствии этих белков. В контрольных экспериментах использовали M.Ecl18kI или M.SsoII дикого типа. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины, при напряженности поля 5 В/см в ТВЕ-буфере. Радиоактивную метку содержали только полученные РНК-транскрипты. В присутствии SsoII-подобных МТаз, способных выступать в роли регуляторных белков, наблюдалось увеличение радиоактивности зоны, соответствующей РНК-транскрипту, синтезируемому с промотора гена ЭР, и уменьшение радиоактивности зоны РНК-транскрипта, синтезируемого с промотора гена МТазы. Определяли долю (%) транскрипта гена ЭР в суммарной радиоактивности полученных транскриптов (принятой за 100%) при различных концентрациях МТазы. Для корректного сравнения выхода продуктов транскрипции при проведении реакции использовали одинаковые активные концентрации МТаз. Их определяли из графиков для расчета K_d комплексов белков с дуплексом IV, содержащим регуляторный участок, методом Скэтчарда [15]. Строили кривые зависимости доли транскрипта, полученного с промотора гена ЭР, от активной концентрации МТазы. Затем определяли относительный выход этого транскрипта на единицу активной концентрации каждой из МТаз. Для этого рассчитывали соотношение значений углового коэффициента (тангенса угла наклона) начального прямолинейного участка кривой для мутантной МТазы и M.Ecl18kI (или M.SsoII) дикого типа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование РНК-полимеразы и M.Ecl18kI с фрагментами ДНК, содержащими межгенную область системы Р-М Ecl18kI

Генетическая организация системы Р-М Ecl18kI (на основании данных [8, 11]) представлена на рис. 2 на примере 247-звенного ДНК-фрагмента I. Промо-

тор гена МТазы расположен непосредственно перед ее регуляторным участком и частично перекрывается с местом посадки M.Ecl18kI. Мы предположили, что механизм негативной регуляции экспрессии собственного гена M.Ecl18kI может заключаться в физическом блокировании доступа РНКП к промотору гена МТазы при связывании M.Ecl18kI с регуляторным участком.

Для проверки этого предположения изучено комплексообразование обоих белков с 116-звенным ДНК-фрагментом II, содержащим межгенную область системы Р-М Ecl18kI (регуляторный участок, точку инициации транскрипции и промоторные области гена МТазы – *ecl18kIM*), но не содержащим промоторные элементы гена ЭР – *ecl18kIR* (рис. 3А). При добавлении РНКП к смеси МТазы и ДНК в реакционной смеси не наблюдалось появления других комплексов, кроме комплексов МТазы-ДНК и РНКП-ДНК. Этот факт исключает возможность непосредственного контакта M.Ecl18kI с РНКП. Более того, при добавлении 5-кратного избытка M.Ecl18kI (относительно РНКП) комплекс РНКП-ДНК практически исчезал. Следовательно, связывание МТазы с регуляторным участком действительно препятствует взаимодействию РНКП с промоторной областью генов системы Р-М SsoII (рис. 3Б).

Эффективность связывания РНКП и M.Ecl18kI с промотором МТазы и с регуляторным участком оценивали, определяя значения K_d ДНК-белковых комплексов. Для комплекса M.Ecl18kI с ДНК-фрагментом II $K_d = 12 \pm 1$ нМ, а для комплекса РНКП с тем же фрагментом $K_d = 25 \pm 1$ нМ. Таким образом, контроль уровня экспрессии МТазы обусловлен конкуренцией РНКП и M.Ecl18kI за место связывания. По-видимому, незначительное (лишь в 2 раза) отличие в сродстве МТазы и РНКП к данному участку ДНК позволяет предотвратить преждевременное ингибирование собственного синтеза M.Ecl18kI, т.е. более тонко контролировать уровень экспрессии гена МТазы. Таким образом, уровень синтеза M.Ecl18kI не понижается ниже минимального, обеспечивающего поддержание специфического метилирования клеточной ДНК.

МТазы располагаются достаточно близко к точке инициации транскрипции гена ЭР (рис. 2), и потому наиболее вероятным было бы негативное влияние M.Ecl18kI на транскрипцию гена *ecl18kIR*. Однако наблюдается противоположный эффект. Мы предположили, что возможна одновременная посадка РНКП и M.Ecl18kI на один ДНК-фрагмент, когда РНКП взаимодействует с промотором гена ЭР, а МТазы – со своим регуляторным участком. Данное предположение подтверждено экспериментально (рис. 3В,Г): при последовательном добавлении РНКП и M.Ecl18kI

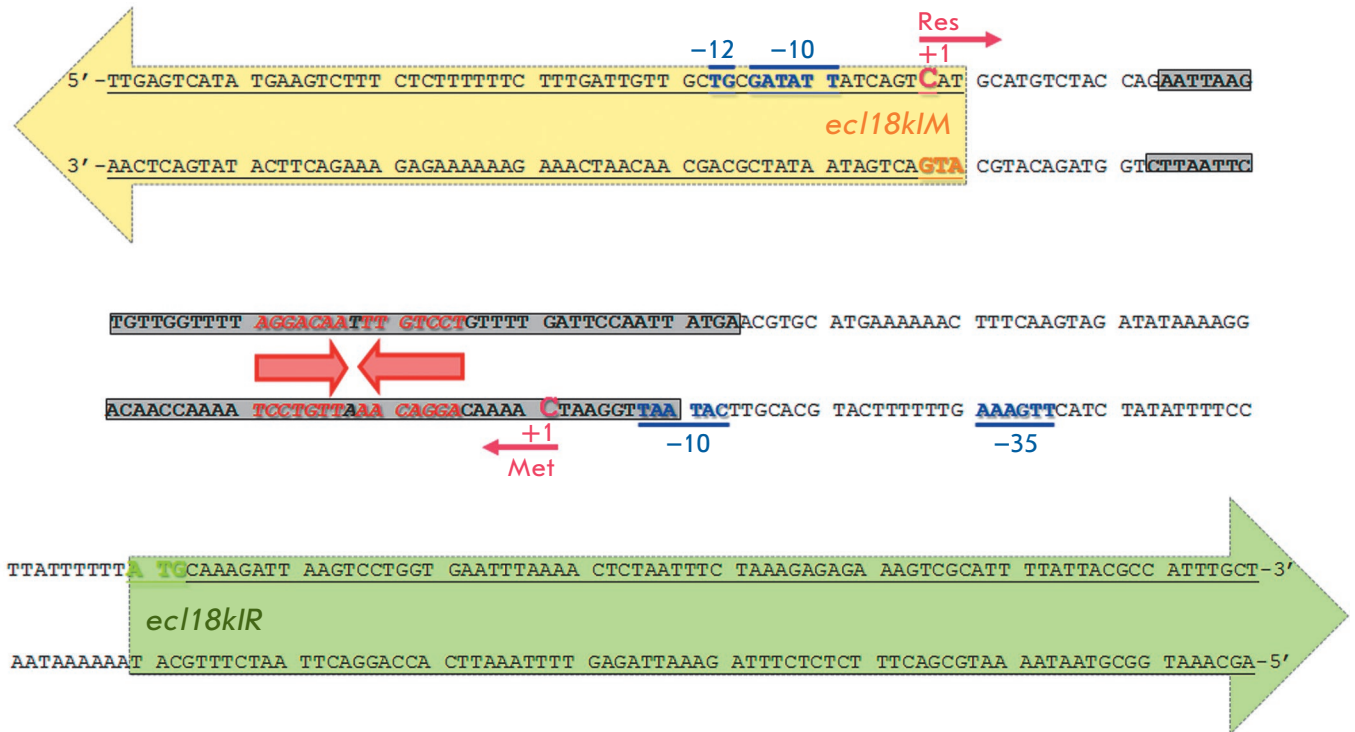


Рис. 2. Генетическая организация промоторной области генов системы P–M Ecl18kI, ДНК-фрагмент I. Направления генов MТазы и ЭР показаны желтыми и зелеными стрелками соответственно. Инициаторные кодоны также выделены желтым или зеленым цветом. Участок, защищаемый MТазой от гидролиза ДНКазой I, выделен серым цветом. Красным шрифтом и красными стрелками отмечен регуляторный участок M.Ecl18kI, представляющий собой инвертированный повтор. Точки инициации транскрипции выделены розовым цветом, промоторные элементы – синим

к 247-звенному ДНК-фрагменту I наблюдается появление «тройного» комплекса (предположительно РНКП–M.Ecl18kI–ДНК) с меньшей подвижностью в геле по сравнению с комплексами РНКП–ДНК и M.Ecl18kI–ДНК. Поскольку с одним регуляторным участком связываются две молекулы M.SsoII [12], наиболее вероятно, что в состав каждого из комплексов: РНКП–M.Ecl18kI–ДНК и M.Ecl18kI–ДНК, входят две молекулы M.Ecl18kI.

Сравнение комплексообразования РНКП с двумя разными промоторами показало, что степень связывания РНКП с ДНК-фрагментом III (рис. 3Д,Е), содержащим точку инициации транскрипции и промоторные области только гена *ecl18kIR*, в 4 раза меньше степени связывания с ДНК-фрагментом II, содержащим точку инициации транскрипции и промоторные области только гена *ecl18kIM*. Таким образом, промотор гена *ecl18kIM* сильнее промотора гена *ecl18kIR*, и в отсутствие M.Ecl18kI транскрипция происходит в первую очередь с промотора гена MТазы. Данное явление также может быть обусловлено транскрипционной интерференцией по механизму «сидячей утки» [16], когда скорости перехода открытого

комплекса РНКП в элонгационный для двух близко расположенных промоторов сильно отличаются, и активность слабого промотора подавляется из-за интенсивной транскрипции более сильного.

Анализ способности N-концевой области M.Ecl18kI регулировать транскрипцию генов в системе рестрикции–модификации *in vitro*

Опыты с делеционными мутантами показали, что способность M.SsoII выступать в роли фактора транскрипции обусловлена именно N-концевой областью этого белка, состоящей из 71 а.о. [3]. Аминокислотные последовательности N-концевых областей M.Ecl18kI и M.SsoII имеют значительное сходство с С-белками. Сравнение регуляторного участка M.SsoII с идеализированной последовательностью С-боксов 5'-GACT...AGTC-3' [17] показало совпадение 6 из 8 нуклеотидов. Учитывая значительную вариабельность последовательностей самих участков связывания С-белков, регуляторный участок, узнаваемый M.Ecl18kI, также можно отнести к С-боксам. Делеционный мутант Δ(72–379)M.Ecl18kI, представляющий собой N-концевую область M.Ecl18kI, сохра-

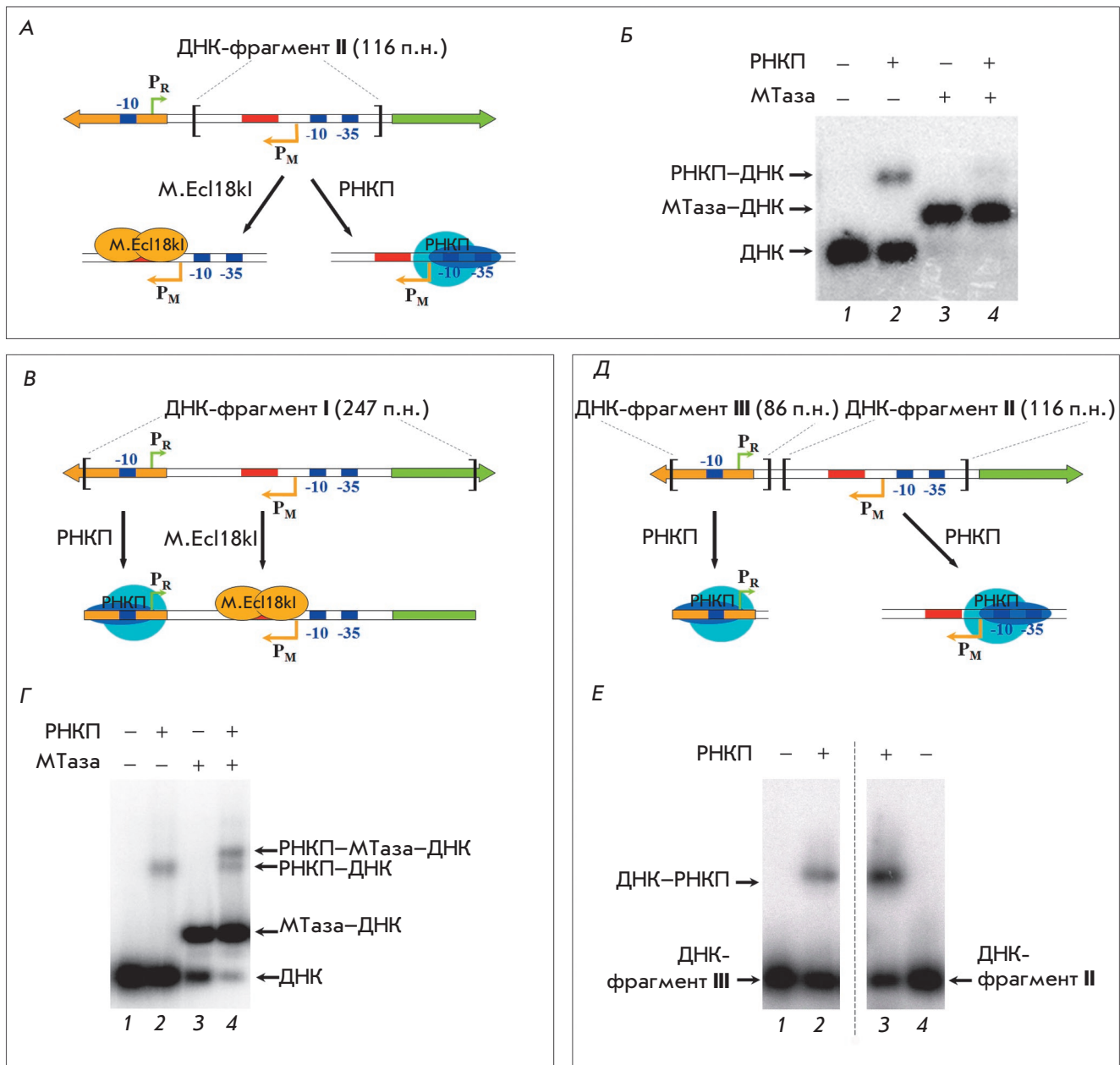


Рис. 3. Комплексообразование М.Ес18к1 и РНКП с фрагментами ДНК, содержащими различные элементы межгенной области системы Р-М Ес18к1. **А, В, Д** – схемы образования ДНК-белковых комплексов. Направления генов МТаза и ЭР показаны желтыми и зелеными стрелками соответственно. P_R , P_M – точки инициации транскрипции генов ЭР и МТаза соответственно (отмечены также тонкими стрелками). Промоторные элементы выделены синим цветом, регуляторный участок МТаза – красным. **Б, Г** – комплексообразование РНКП (30 нМ) с ДНК-фрагментами II или I соответственно (15 нМ) в присутствии (4) или в отсутствие (2) избытка М.Ес18к1 (150 нМ) в условиях специфического связывания (в присутствии 300 нМ гепарина). 1 – исходный ДНК-фрагмент, 3 – комплексообразование М.Ес18к1 с ДНК-фрагментами II и I в отсутствие РНКП. **Е** – комплексообразование РНКП (190 нМ) с ДНК-фрагментами III (30 нМ, дорожка 2) и II (30 нМ, дорожка 3). Дорожки 1 и 4 – исходные ДНК-фрагменты III и II соответственно. Радиоавтографы 1% агарозного геля

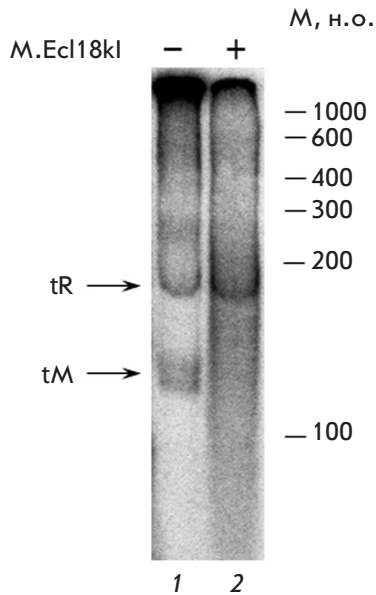


Рис. 4. Анализ РНК-транскриптов, синтезируемых с ДНК-фрагмента I, методом электрофореза в 5% ПААГ в денатурирующих условиях. Радиоавтограф: 1 – продукты транскрипции в отсутствие M.Ecl18kI; 2 – продукты транскрипции в присутствии 4-кратного избытка M.Ecl18kI (в расчете на активные концентрации ферментов). Справа указано расположение маркера (M) фрагментов РНК разной длины. tR – РНК-транскрипт, полученный с промотора гена *ec18kIR*, tM – РНК-транскрипт с промотора гена *ec18kIM*

няет ярко выраженную вторичную структуру и способен специфически связывать ДНК, содержащую регуляторный участок, хотя эффективность этого связывания на порядок ниже, чем у полноразмерного белка [12].

Нами изучено влияние $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI на транскрипцию генов *ec18kIR* и *ec18kIM in vitro*. В контрольном опыте использовали полноразмерную M.Ecl18kI (рис. 4). В результате транскрипции с 247-звенного ДНК-фрагмента I образуются два продукта, соответствующие транскриптам с промотора гена ЭР (~190 нуклеотидов) и с промотора гена МТазы (~110 нуклеотидов). При титровании реакционной смеси возрастающими количествами M.Ecl18kI доля транскрипта гена МТазы существенно снижается, а доля транскрипта гена ЭР увеличивается (рис. 4, 5). В то же время добавление в реакционную смесь $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI не вызывает изменений в соотношении выходов двух транскриптов, т.е. данный делеционный мутант не способен выступать в роли транскрипционного фактора (рис. 5). Возможно, это объясняется низким сродством $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI к ДНК, содержащей регуляторный участок [12]: такой белок не может эффективно

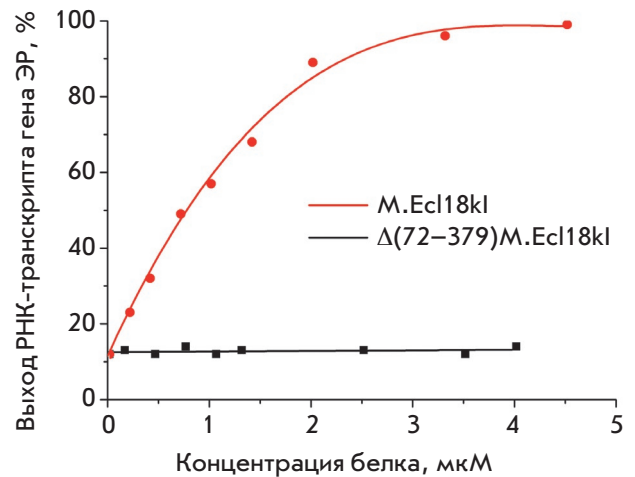


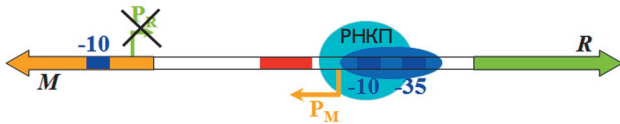
Рис. 5. Зависимость выхода РНК-транскрипта с промотора гена *ec18kIR* от концентрации M.Ecl18kI или ее делеционной мутантной формы $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI

конкурировать с РНКП за связывание с промоторной областью. Возможно также, что делеционный мутант закрывает собой значительно меньший участок ДНК, чем полноразмерная M.Ecl18kI, потому он не является стерическим препятствием для РНКП. Таким образом, наличие области, ответственной за метилирование, необходимо для поддержания регуляторной функции M.Ecl18kI. Этот результат соответствует недавно предложенной нами структурной модели комплекса SsoII-подобных МТаз с регуляторным участком в составе межгенной области системы Р-М: N-концевые области двух молекул МТазы специфически взаимодействуют с регуляторным участком, а области, ответственные за метилирование, неспецифическим образом связаны с ДНК, фланкирующей регуляторный участок [18].

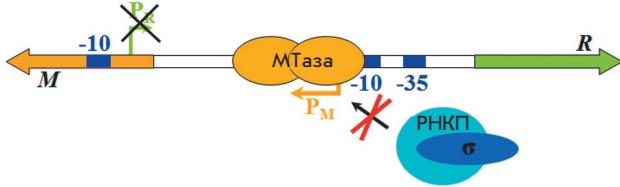
Модель регуляции транскрипции генов в системе Р-М Ecl18kI

После проникновения системы Р-М в клетку происходит активный синтез МТазы с более сильного промотора, что необходимо для защиты клеточной ДНК от гидролиза ЭР. Со временем нарабатывается определенное количество МТазы, обеспечивающее эффективную защиту клетки от инфекции бактериофагом, после чего две молекулы МТазы связываются с регуляторным участком и блокируют доступ РНКП к промотору собственного гена (рис. 6). Непосредственного образования комплекса между МТазой и РНКП в таком случае не происходит, т.е. механизм подавления транскрипции гена МТазы основан только на конкуренции между МТазой и РНКП за связывание с межгенной областью системы Р-М

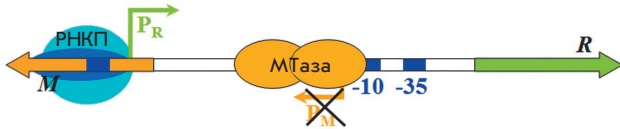
1. Стадия проникновения в клетку. Активный синтез МТазы для защиты ДНК клетки-хозяина



2. Накопление МТазы. Взаимодействие МТазы с регуляторным участком



3. Стадия защиты клетки от инфекции бактериофагом. Ингибирование синтеза МТазы. Активация транскрипции гена ЭР



4. Элонгация транскрипции → диссоциация МТазы из комплекса с ДНК

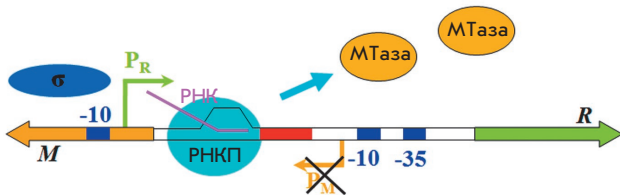


Рис. 6. Предполагаемый механизм регуляции транскрипции генов в SsoII-подобных системах P–M. Обозначения аналогичны приведенным в подписях к рис. 2 и 3

Ecl18kI. Близкие значения K_d свидетельствуют о том, что даже небольшие изменения концентрации МТазы должны отражаться на эффективности транскрипции гена МТазы.

Описанное в работе [18] взаимодействие области M.SsoII, ответственной за метилирование, с ДНК, фланкирующей регуляторный участок, по-видимому, обеспечивает дополнительную прочность ДНК-белкового комплекса. Это обстоятельство позволяет SsoII-подобной МТазе успешно конкурировать с РНКП за связывание с промоторной областью, что приводит к подавлению транскрипции гена МТазы и стабилизации ее концентрации в клетке. Можно предположить, что связывание области фермента, ответственной за метилирование, с ДНК, фланкирующей регуляторный участок, яв-

ляется компенсаторным механизмом, необходимым для того, чтобы димер МТазы, связанный с регуляторным участком ДНК, мог влиять на транскрипцию не менее эффективно, чем два димера С-белка, связанные с двумя палиндромными участками ДНК. Отсутствие такого «дополнительного» взаимодействия в случае делеционного мутанта, представляющего собой N-концевую область M.Ecl18kI, объясняет малую стабильность его комплекса с ДНК и неспособность регулировать транскрипцию в системе P–M Ecl18kI.

Связывание M.Ecl18kI с регуляторным участком приводит к активации промотора гена ЭР косвенным образом – за счет предотвращения связывания РНКП с промотором гена МТазы. В процессе транскрипции с промотора гена ЭР РНКП «наталкивается» на область МТазы, отвечающую за метилирование, которая неспецифически взаимодействует с областью ДНК, фланкирующей регуляторный участок [18]. Такие неспецифические ДНК-белковые контакты сравнительно легко разрушаются РНКП, «расплетающей» ДНК в элонгационном комплексе. Вероятно, при этом происходит «сталкивание» с ДНК обеих субъединиц МТазы, что может быть связано с понижением сродства фермента к ДНК, «расплетенной» в процессе элонгации.

Влияние единичных аминокислотных замен на регуляторную активность SsoII-подобных метилтрансфераз

Мутантная форма M.SsoII, содержащая замену в области, ответственной за метилирование. Cys142 в молекуле M.Ecl18kI (M.SsoII) играет ключевую роль в катализе переноса метильной группы с кофактора реакции AdoMet на ДНК-субстрат [19]. Замена Cys142 на Ala приводит к потере M.SsoII ферментативной активности. Мутантный белок менее эффективно связывается с участком метилирования, но имеет значительно большее сродство к регуляторному участку (таблица) [9]. В данной работе проверена способность M.SsoII(C142A) регулировать транскрипцию генов системы P–M Ecl18kI *in vitro*.

Выход транскриптов гена *ecl18kIR* в присутствии M.SsoII, M.Ecl18kI или мутантного белка M.SsoII(C142A) практически одинаков (рис. 7 и таблица). Следовательно, потеря метилирующей функции не влияет на способность МТазы действовать как фактор транскрипции.

Мутантные формы M.Ecl18kI, содержащие замены в области, ответственной за регуляторную функцию. На основании модели комплекса N-концевой области M.SsoII с регуляторным

Характеристика ДНК-связывающей, регуляторной и метилирующей активностей МТазы *M.Ecl18kI*, *M.SsoII* и их мутантных форм¹

МТазы	Относительный выход транскрипта гена ЭР на ед. акт. концентрации МТазы	K_d комплекса МТазы с регуляторным участком, нМ ^{1,2}	K_d комплекса МТазы с метилируемым участком, нМ ^{1,3}	Относительная начальная скорость метилирования ^{1,3}
<i>Ecl18kI</i>	1.0	224 ± 24	87 ± 12	1
<i>SsoII</i>	1.0	248 ± 33	144 ± 14	1
<i>SsoII</i> (C142A)	1.0	35 ± 3	172 ± 10	нет
<i>Ecl18kI</i> (R15A)	0.4	56 ± 13	103 ± 24	< 1
<i>Ecl18kI</i> (K21A)	3.9	48 ± 9	87 ± 3	38
<i>Ecl18kI</i> (K31A)	1.0	198 ± 29	26 ± 3	29
<i>Ecl18kI</i> (R35A)	нет	> 4000	140 ± 12	2
<i>Ecl18kI</i> (R38A)	нет	> 4000	96 ± 13	11
<i>Ecl18kI</i> (R39A)	0.4	93 ± 14	266 ± 4	22
<i>Ecl18kI</i> (R42A)	2.5	32 ± 2	256 ± 4	< 1
<i>Ecl18kI</i> (K46A)	13.5	250 ± 32	> 4000	нет
<i>Ecl18kI</i> (K53A)	1.8	206 ± 7	> 4000	нет

¹Данные для *M.Ecl18kI*, *M.SsoII*, *M.SsoII*(C142A), *M.Ecl18kI*(R15A), *M.Ecl18kI*(R35A), *M.Ecl18kI*(R38A), *M.Ecl18kI*(R39A) и *M.Ecl18kI*(R42A) опубликованы ранее [9].

²Изучение комплексообразования проводили с 31-звенным ДНК-дуплексом **IV**, содержащим регуляторный участок: 5' -ТТGGТТТТ**AGGACAATTGTCCTG**ТТТТGAT-3'

3' -ААССАААА**TCCTGTTAAACAGGA**СААААСТА-5' (ДНК-дуплекс **IV**).

³Изучение комплексообразования и метилирующей активности проводили с 30-звенным ДНК-дуплексом **V**, содержащим участок метилирования:

5' -GATGCTGCCAA**CCTGG**CTCTAGCTTCATAC-3'

3' -СТАСGACGGТТ**GGACC**GGAGATCGAAGTATG-5' (ДНК-дуплекс **V**).

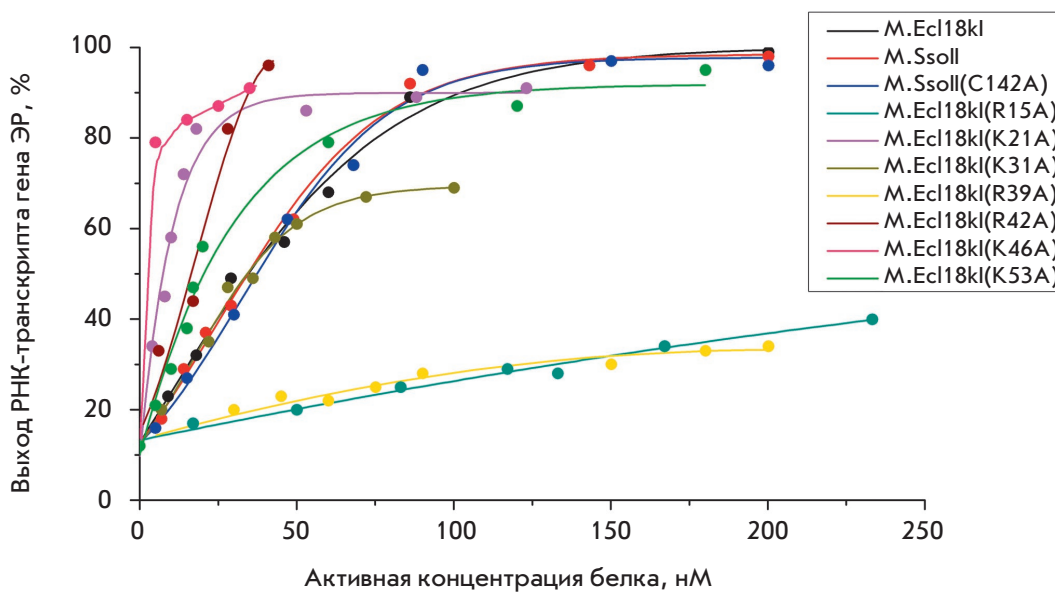


Рис. 7. Зависимость выхода РНК-транскрипта с промотора гена *ecl18kIR* от активной концентрации *M.Ecl18kI*, *M.SsoII* или их мутантных форм: *M.SsoII*(C142A), *M.Ecl18kI*(R15A), *M.Ecl18kI*(K21A), *M.Ecl18kI*(K31A), *M.Ecl18kI*(R39A), *M.Ecl18kI*(R42A), *M.Ecl18kI*(K46A) или *M.Ecl18kI*(K53A)

участком [13] было высказано предположение о взаимодействии остатков Lys21, Lys31, Arg35, Arg38, Arg39 и Arg42 с ДНК (рис. 1). Мы изучили регуляторные свойства мутантных форм M.Ecl18kI, в каждой из которых один из перечисленных остатков заменен на Ala (таблица). В качестве контроля использовали мутантные формы M.Ecl18kI, где один из остатков – Arg15, Lys46 и Lys53 – был заменен на Ala. Регуляторную активность всех мутантных форм M.Ecl18kI проверяли, проводя транскрипцию *in vitro* в присутствии этих белков. В контрольном опыте использовали M.Ecl18kI дикого типа.

Впервые показано, что аминокислотные замены в N-концевой области влияют на способность МТазы регулировать транскрипцию в системе Р–М (таблица). Различная динамика изменения выхода РНК–транскриптов с промотора гена ЭР в условиях одинаковой активной концентрации мутантных форм M.Ecl18kI стала интересным и неожиданным результатом. Мы полагали, что мутантные формы, обладающие высоким сродством к регуляторному участку, должны регулировать транскрипцию более эффективно, в то время как регуляция транскрипции для МТаз с более низким сродством должна ослабевать. Действительно, в присутствии M.Ecl18kI(R35A) и M.Ecl18kI(R38A), которые практически не взаимодействуют с регуляторным участком ДНК (таблица, [9]), результат был таким же, как и при полном отсутствии белка: преобладание в реакционной смеси РНК–транскрипта с промотора гена МТазы. Очевидно, что данные мутантные формы МТазы не способны регулировать транскрипцию генов в системе Р–М Ecl18kI.

В присутствии остальных мутантных форм M.Ecl18kI, которые эффективно связывались с регуляторным участком, наблюдалось изменение количества РНК–транскрипта, синтезируемого с промотора гена ЭР (рис. 7, таблица). Однако определенная корреляция между сродством белков к регуляторному участку ДНК и выходом продукта транскрипции на единицу активной концентрации МТаз, помимо M.Ecl18kI(R35A) и M.Ecl18kI(R38A), обнаружена еще только у трех мутантных форм: M.Ecl18kI(K21A), M.Ecl18kI(K31A) и M.Ecl18kI(R42A). У M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(R42A) сродство к регуляторному участку ДНК и эффективность регуляции транскрипции на единицу активной концентрации МТаз больше, чем у M.Ecl18kI дикого типа. Сродство M.Ecl18kI(K31A) к регуляторному участку и выход РНК–транскрипта на единицу активной концентрации МТаз сравнимы со значениями для M.Ecl18kI дикого типа.

Вместе с тем мутантные белки M.Ecl18kI(R39A) и M.Ecl18kI(R15A), имеющие более высокое сродство

к регуляторному участку ДНК (в 2.5 и 4 раза соответственно), чем M.Ecl18kI дикого типа, менее эффективно регулируют транскрипцию в системе Р–М Ecl18kI. Выход РНК–транскрипта на единицу активной концентрации M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A) выше, чем у M.Ecl18kI дикого типа (в 13 и 1.8 раза соответственно), несмотря на то, что константы диссоциации их комплексов с 31-звенным дуплексом IV, содержащим регуляторный участок, имеют сравнимые значения.

Отсутствие корреляции между сродством к регуляторному участку и выходом РНК–транскриптов может быть связано с тем, что величина K_d отражает термодинамическую стабильность комплекса МТазы с ДНК, а относительный выход продукта транскрипции на единицу активной концентрации МТазы косвенным образом характеризует скорость образования комплекса МТазы с ДНК.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК-СУБСТРАТА

Нами изучено влияние замены остатка Lys21, Lys31, Lys46 или Lys53 на Ala в регуляторной области M.Ecl18kI на выполнение этим белком функции метилирования. С этой целью определяли K_d комплексов мутантных форм МТазы с 30-звенным дуплексом V, содержащим участок метилирования, и скорость метилирования данного субстрата (таблица). Мутантные формы M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(K31A) эффективно связываются с субстратом V. Скорость метилирования ДНК этими белками была в 30–40 раз выше по сравнению с исходным ферментом. Мутантные формы M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A), напротив, характеризуются низким сродством к дуплексу V и не способны его метилировать.

Аналогичные исследования выполнены нами ранее для мутантных белков, в которых на Ala заменили один из остатков Arg (R15, R35, R38, R39 или R42), также расположенных в регуляторной области M.Ecl18kI (таблица) [9]. Сопоставление полученных данных позволяет сделать следующие заключения. В целом сродство мутантных форм M.Ecl18kI к ДНК–субстрату V снижается по мере приближения аминокислотной замены к области белка, ответственной за метилирование (таблица). Так, значения K_d комплекса M.Ecl18kI(R15A), M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(R38A) с дуплексом V совпадают в пределах ошибки с значениями для M.Ecl18kI дикого типа, а в случае M.Ecl18kI(K31A) сродство к ДНК–дуплексу V даже в 3 раза выше. У M.Ecl18kI(R35A) сродство к участку метилирования уже в 1.6 раза ниже, чем у МТазы дикого типа, у M.Ecl18kI(R39A) и M.Ecl18kI(R42A) – в 3 раза ниже, а M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A) практически не связываются с дуплексом V.

М.Ecl18kI(K21A), М.Ecl18kI(K31A) и М.Ecl18kI(R39A) очень эффективно метилируют ДНК-субстрат **V**, однако между этими мутантными формами не наблюдается корреляции ни по сродству к участку метилирования, ни по способности к регуляции (таблица). Большая по сравнению с М.Ecl18kI степень метилирования дуплекса **V** отмечена и в случае М.Ecl18kI(R38A) с «выключенной» регуляторной функцией. Эффективность метилирования М.Ecl18kI(R35A) практически не меняется, хотя его сродство к участку метилирования снижается в 1.6 раза, а регуляторная функция «выключена». Замена Arg15 и Arg42 на Ala приводит к снижению способности фермента к метилированию субстрата в 2.5–3 раза. Мутантные формы М.Ecl18kI(K46A) и М.Ecl18kI(K53A) не способны метилировать дуплекс **V** из-за чрезвычайно низкого сродства к нему.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что аминокислотные замены в области М.Ecl18kI, ответственной за регуляцию, влияют на способность этого белка связывать и метилировать ДНК-субстрат, хотя единой для всех мутантных форм закономерности не наблюдается.

ВЫВОДЫ

Фермент модификации – С5-цитозиновая МТаза Ecl18kI – регулирует транскрипцию генов системы рестрикции-модификации Ecl18kI *in vitro*. Ингибирование транскрипции собственного гена обусловлено конкуренцией РНКП и фермента модификации за участок связывания вблизи промотора гена МТаза. Активация транскрипции гена эндонуклеазы

рестрикции Ecl18kI происходит за счет исчезновения транскрипционной интерференции в результате связывания фермента модификации с регуляторным участком. Впервые показано, что наличие области белка, ответственной за метилирование, необходимо для выполнения этим ферментом функции фактора транскрипции. Точечная мутация, «выключающая» каталитическую функцию МТаза, приводит к увеличению сродства мутантной формы к регуляторной последовательности и не влияет на его способность играть роль фактора транскрипции. С другой стороны, мутантные формы М.Ecl18kI(K46A) и М.Ecl18kI(K53A), эффективно регулирующие транскрипцию в системе Р-М Ecl18kI, не модифицируют ДНК-субстрат из-за чрезвычайно низкого сродства к участку метилирования. Замена остатков Arg35 или Arg38 МТаза Ecl18kI на Ala не только приводит к существенному ухудшению связывания белка с регуляторным участком, но и препятствует выполнению белком регуляторной функции, однако эффективность метилирования ДНК в этом случае значительно повышается. Очевидна взаимосвязь между функционированием двух ДНК-узнающих центров SsoII-подобных МТаз. ●

Работа поддержана РФФИ

(гранты № 12-04-01399_a и 12-04-32103),

а также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (Государственный контракт № П1045).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kobayashi I. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 3742–3756.
- Нагорных М.О., Богданова Е.С., Проценко А.С., Захарова М.В., Северинов К.В. // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1–10.
- Karyagina A., Shilov I., Tashlitskii V., Khodoun M., Vasil'ev S., Lau P.C.K., Nikolskaya I. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 2114–2120.
- Denjmukhametov M.M., Brevnov M.G., Zakharova M.V., Repyk A.V., Solonin A.S., Petrauskene O.V., Gromova E.S. // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 233–236.
- Zakharova M.V., Beletskaya I.V., Denjmukhametov M.M., Yurkova T.V., Semenova L.M., Shlyapnikov M.G., Solonin A.S. // Mol. Genet. Genomics. 2002. V. 267. P. 171–178.
- Miyahara M., Ishiwata N., Yoshida Y. // Biol. Pharm. Bull. 1997. V. 20. P. 201–203.
- Ibáñez M., Alvarez I., Rodríguez-Peña J.M., Rotger R. // Gene. 1997. V. 196. P. 145–158.
- Protsenko A., Zakharova M., Nagornykh M., Solonin A., Severinov K. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 5322–5330.
- Федотова Е.А., Проценко А.С., Захарова М.В., Лаврова Н.В., Алексеевский А.В., Орецкая Т.С., Карягина А.С., Солонин А.С., Кубарева Е.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 108–116.
- Воробьева О.В., Васильев С.А., Карягина А.С., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 1074–1080.
- Shilov I., Tashlitsky V., Khodoun M., Vasil'ev S., Alekseev Y., Kuzubov A., Kubareva E., Karyagina A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 2659–2664.
- Рязанова А.Ю., Молочков Н.В., Абросимова Л.А., Алексеевский А.В., Карягина А.С., Проценко А.С., Friedhoff P., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. С. 911–921.
- Karyagina A.S., Alexeevski A.V., Golovin A.V., Spirin S.A., Vorob'eva O.V., Kubareva E.A. // Biophysics. 2003. V. 48. Suppl. 1. P. S45–S55.
- Severinov K., Darst S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 13481–13486.
- Scatchard G. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. V. 51. P. 660–672.
- Callen B.P., Shearwin K.E., Egan J.B. // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 339–345.
- Vijesurier R.M., Carlock L., Blumenthal R.M., Dunbar J.C. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 477–487.
- Ryazanova A.Yu., Winkler I., Friedhoff P., Viryasov M.B., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2011. V. 30. P. 632–650.
- Cheng X., Kumar S., Posfai J., Pflugrath J.W., Roberts R.J. // Cell. 1993. V. 74. P. 299–307.

УДК 577.21

Условия агрегации мутантных белков в клеточных моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза

В. Ф. Лазарев*, Д. В. Сверчинский, М. В. Ипполитова, А. В. Степанова, И. В. Гужова, Б. А. Маргулис

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

*E-mail: vl.lazarev@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2012

РЕФЕРАТ Большинство нейродегенеративных патологий связано с появлением цитотоксических олигомеров и агрегатов мутантных белков, вызывающих дисфункцию клеток мозга и их гибель. В представленной работе изучали функции белковых факторов, как способствующих образованию агрегатов, так и предотвращающих этот процесс. К таким белкам можно отнести глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (ГАФД), тканевую транслгутаминазу (тТГ) и молекулярный шаперон – белок теплового шока 70 (БТШ70). Используя технологию siРНК, мы показали, что подавление экспрессии ГАФД в модели болезни Хантингтона (БХ) вызывает снижение на 45–50% уровня агрегации мутантного хантингтина, содержащего повтор из 103 остатков глутамина, и повышение количества выживших клеток. Впервые установлено, что блокирование синтеза ГАФД снижает степень агрегации супероксиддисмутазы-1 (СОД1) с мутацией G93A в модели амиотрофического бокового склероза (АБС). Обработка клеток, имитирующих БХ и АБС, ингибитором активности ГАФД, гидроксинонналом (ГНЕ) также снижает количество агрегирующего материала. Агрегации мутантных белков способствует также тканевая транслгутаминаза. Подавление активности этого фермента с помощью цистамина препятствует образованию агрегатов мутантной СОД1 и хантингтина. Роль БТШ70 в контроле агрегации мутантного хантингтина изучали с использованием линии клеток с индуцибельной экспрессией шаперона. Увеличивая содержание БТШ70, мы добились снижения числа и размеров растущих агрегатов мутантного хантингтина. Таким образом, модуляция функции/количества трех белков (ГАФД, транслгутаминазы и БТШ70) влияет на патогенез таких распространенных нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Хантингтона и амиотрофический боковой склероз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейродегенеративные заболевания, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, шапероны, мутантные белки, агрегация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок (Enhanced Green Fluorescence Protein); АБС – амиотрофический боковой склероз; БТШ – белок теплового шока; БХ – болезнь Хантингтона; ГАФД – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; ГНЕ – гидроксинонналом; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; СОД – супероксиддисмутаза; тТГ – тканевая транслгутаминаза; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Причиной большинства нейродегенеративных заболеваний является прогрессирующая гибель нейронов в определенных отделах головного мозга. Развитие подобных патологий начинается с накопления внутри клетки (болезнь Паркинсона, Хантингтона) или вне ее (болезнь Альцгеймера) агрегатов мутантных белков или их олигомеров [1]. Такие структуры токсичны для клеток мозга, они могут приводить к немедленной гибели нейронов, хотя есть сведения о том, что они могут существовать в нейронах десятки лет

и лишь в определенный момент становятся активным токсическим фактором [2].

В настоящее время предложены две гипотезы формирования агрегатов мутантных белков. Согласно первой из них, агрегаты могут формироваться в результате образования водородных связей между β-слоями молекулы поврежденного или мутантного белка [3]. Подобные структуры недоступны для сильных диссоциирующих растворителей, в частности для додецилсульфата натрия (ДСН). По-видимому, высокая плотность агрегирующего материала не по-

зволяет клетке использовать протеолитические системы, протеасомы и фагосомы в борьбе с агрегатами [4]. Согласно второй гипотезе, амилоидные агрегаты могут образоваться за счет ковалентных сшивок между молекулами мутантного белка и другими клеточными белками. Формирование таких сшивок характерно для так называемых полиглутаминовых патологий, в основе которых лежат мутации, приводящие к появлению аномально длинных глутаминовых повторов в молекулах хантингтина, атаксинов разных типов, рецептора андрогенов [5–7]. Полиглутаминовые повторы могут вырезаться и в реакции, катализируемой тканевой трансглутаминазой (тТГ), образовывать ковалентные связи с донорами ϵ -аминогрупп лизинов. Гипотеза о ключевой роли тТГ в формировании нерастворимых агрегатов мутантного хантингтина подтверждается данными о том, что полиглутаминовые домены хантингтина являются активным субстратом для этого фермента, в отсутствие тТГ агрегация практически прекращается [8].

Донором лизинов в реакции, катализируемой тТГ, может служить гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФД) [9]. Недавно мы показали, что ГАФД действительно способна формировать агрегаты с мутантным хантингтином [10]. Данные о том, что ГАФД обнаруживается в агрегатах или отложениях других мутантных белков, например, амилоидного предшественника и α -синуклеина [11, 12], приводят к мысли о ГАФД как о некоем универсальном субстрате для процессов агрегации [13]. Одна из задач нашей работы состояла в том, чтобы понять, могут ли ГАФД, а также тТГ не только участвовать в агрегации мутантного хантингтина, но и играть роль в патогенезе совершенно иного заболевания – амиотрофического бокового склероза (АБС).

АБС – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, при котором наблюдается дегенерация нейронов спинного мозга, ствола мозга и коры [14]. Приблизительно 10% случаев АБС являются наследственными, из них 20% обусловлены мутациями в гене супероксиддисмутазы-1 (СОД1). Мутации встречаются во всех экзонах гена *СОД1*, некоторые из них вызывают нарушения фолдинга и агрегацию белкового продукта. К таким мутациям относится замена глицина в положении 93 на аланин, G93A [15]. Таким образом, первая часть нашей работы посвящена анализу функций ГАФД и тТГ в клетках, имитирующих БХ и АБС.

Кроме белков, вовлеченных в образование цитотоксических олигомеров и агрегатов, в клетке имеются факторы, препятствующие этому процессу. К таким факторам в первую очередь относятся

молекулярные шапероны, особенно белки класса БТШ70 и кошапероны группы Hdj1/2 [16, 17]. Повышенная экспрессия генов этих факторов в клетке или в трансгенном организме приводит к торможению агрегации и снижению патогенных проявлений [18]. Предполагается, что на начальных этапах формирования агрегатов шаперон БТШ70 связывает их компоненты и поэтому тормозит процесс агрегации [10, 19, 20]. Во второй части нашей работы рассмотрены особенности функций БТШ70 в процессе агрегации мутантного хантингтина в клеточной модели БХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH и SH-SY-5Y получены от Д. Рубинштейна (D. Rubinstein) из Университета Кембриджа (Великобритания); культура нейрональных эмбриональных клеток HNSC3148 – от Л.И. Корочкина (Институт биологии гена РАН, Москва). В работе также использовали клон линии SK-N-SH/hsp70, полученный ранее в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН с помощью трансфекции клеток плазмидой со вставкой гена *hsp70* под контролем металлотионеинового промотора [10, 21]. Клетки культивировали в среде ДМЕМ («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением *L*-глутамина, 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 50 мг/мл гентамицина («ПанЭко», Москва) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки SK-N-SH/hsp70 растили в присутствии 100 мкМ генецитина.

Трансфекция клеток

В работе использовали плазмиды, содержащие экзон 1 гена, кодирующего хантингтин с нормальным (Q25) и патогенным (Q103) числом остатков глутамина (далее гены Q25 и Q103 соответственно), сшитый с геном *EGFP*, кодирующим усиленный зеленый флуоресцентный белок (плазмиды предоставлены Д. Рубинштейном), и плазмиды, содержащие ген супероксиддисмутазы-1 дикого типа (СОД1_{wt}) и мутантного варианта СОД1_{G93A}, также сшитые с геном *EGFP* (получены от М. Читэм (M. Cheetham), Колледж Университета Лондона, Великобритания). Малая интерферирующая РНК (siРНК), специфичная к ГАФД, получена из Ambion (Ambion/Life Technology/Invitrogen, США).

Клетки высевали в лунки 24- или 6-луночного планшета за 24 ч до трансфекции в концентрации 3×10^5 кл./мл. Трансфекцию осуществляли с помощью реагента Lipofectamine-PLUS (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Клетки трансфицировали siРНК *GAPDH* за 1 сут до трансфекции генами *Q103* и *Q25* или одновременно с генами *СОД1_{G93A}* или *СОД1_{wt}*.

Конфокальная микроскопия

Клетки высевали на покровные стекла, помещенные в лунки 24-луночного планшета, в концентрации 3×10^5 кл./мл. Для определения колокализации ГАФД и тТГ с *Q103* клетки через 48 ч после трансфекции фиксировали 4% формальдегидом (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 30 мин, промывали чистым ФСБ и пермеабелизовали с помощью холодного 96% этанола в течение 5 мин при температуре -20°C . Клетки инкубировали со специфическими антителами против ГАФД (Abcam, Великобритания) или тТГ (Sigma, США) в течение ночи, после промывок в ФСБ инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой CY3 (JacksonLab., США). Препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Германия). Чтобы избежать неспецифической интерференции флуорохромов применяли последовательный режим сканирования. Размер агрегатов определяли с помощью конфокального микроскопа LSM510 Zeiss и программы Zeiss LSM Image Examiner, версия 2.80.1123 (Carl Zeiss, Германия).

Определение жизнеспособности клеток

Для проверки выживаемости клеток, синтезирующих патогенные пептиды на фоне подавленной экспрессии ГАФД, использовали метод оценки жизнеспособности по Мосману [22]. Клетки нейробластомы SK-N-SH помещали в лунки 96-луночного планшета, трансфицировали siРНК, а затем геном *Q103* как описано выше. Через 72 ч после начала эксперимента из лунок удаляли среду, в каждую лунку добавляли по 90 мкл свежей среды и 10 мкл раствора МТТ (бромид 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-тетразолия, Sigma, США), 5 мг/мл, в стерильном ФСБ. Клетки инкубировали с МТТ в течение 4 ч при 37°C , после чего среду с МТТ удаляли, и в лунки вносили по 100 мкл закисленного изопропанола (0.04 н. HCl) для того, чтобы растворить синие кристаллы формазана в живых клетках. Сигнал измеряли на иммунохимическом анализаторе Флюорофот (ООО «ПРОБАНАУЧПРИБОР», Россия) при длине волны 570 и 630 нм.

Анализ агрегации белков

Агрегацию белков анализировали с использованием двух систем: *ex vivo* и *in vitro*. В системе *ex vivo* клетки нейробластомы SK-N-SH трансфицировали плазмидами, содержащими экзон 1 гена хантингтина с нормальным (*Q25*) и патогенным (*Q103*) числом остатков глутамина. По истечении 8 ч клет-

ки, когда в них уже накапливается достаточное для анализа количество мутантного белка, но еще не происходит образования агрегатов, лизировали в буфере следующего состава: 25 мМ Трис-HCl pH 8.0, 20 мМ NaCl, 1 мМ EDTA. После трехкратного цикла замораживания-оттаивания на льду лизаты центрифугировали при 10000 *g*, измеряли концентрацию общего белка в супернатанте по методу Брэдфорд [23]. Лизаты инкубировали в течение 48 ч при 37°C , после чего анализировали с помощью метода ловушки на фильтре.

В системе *in vitro* клетки нейробластомы SK-N-SH трансфицировали плазмидами, кодирующими экзон 1 гена *Q25* и *Q103* или генами *СОД1_{wt}* и *СОД1_{G93A}*. Через 24 ч после трансфекции клеток *Q25* либо *Q103* или через 48 ч после трансфекции *СОД1* клетки собирали, трижды промывали холодным ФСБ, осаждали центрифугированием при 800 *g* в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 2% ДСН. После обработки ультразвуком в течение 1 мин и инкубации при 98°C в течение 2 мин лизаты использовали для изучения образования агрегатов с помощью методов ловушки на фильтре или электрофореза с задержкой в геле.

Метод ловушки на фильтре (Filter trap assay)

Мы использовали метод Filter trap assay, описанный в статье Новоселовой и соавт. [24]. Лизаты трансфицированных клеток нейробластомы SK-N-SH, полученные как описано выше, наносили на ацетатную нитроцеллюлозную мембрану, помещенную в присоединенный к вакуумному насосу аппарат для дот-блотинга (Hemel Hempstead, Великобритания). До и после нанесения лизатов мембрану промывали под давлением буфером следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 0.1% ДСН. Наличие в агрегатах *Q103* или *СОД1* определяли с помощью антител к EGFP.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблотинг

Для приготовления проб клетки собирали, трижды промывали холодным ФСБ, центрифугировали при 800 *g* в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.5% Трипон X-100, 2 мМ EDTA. Лизаты центрифугировали при 10000 *g*, концентрацию суммарного белка в супернатантах определяли по методу Брэдфорд. Для анализа использовали по 50 мкг белка на пробу. После электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon-P (PVDF), размер пор 0.45 мкм, фирма Millipore Corporation, США) с помощью аппарата TransBlot (BioRad, США).

Зоны интересующих белков выявляли при помощи первичных моноклональных или поликлональных антител и вторичных антител против иммуноглобулина мыши или кролика, меченных пероксидазой хрена. Пероксидазную реакцию выявляли методом усиленной хемилюминесценции с использованием системы для визуализации Chemidoc XRC (Bio-Rad, США).

Иммуноблоттинг проводили с использованием моноклональных мышечных антител против EGFP (Abcam, Великобритания) и против ГАФД (Abcam, Великобритания); поликлональных кроличьих антител против БТШ70 (R22) и против тканевой трансглутаминазы (Sigma, США). В качестве вторичных антител использовали антитела против иммуноглобулинов мыши или кролика, меченные пероксидазой хрена (Sigma, США).

Модификация ДСН-ПААГ-электрофореза для анализа ДСН-нерастворимой клеточной фракции (электрофорез с задержкой в геле, Electrophoretic retardation)

Для анализа уровня исследуемых белков в ДСН-нерастворимой клеточной фракции использовали модификацию ДСН-ПААГ-электрофореза, при которой нерастворимые комплексы задерживались в концентрирующем геле. Клеточные осадки растворяли в буфере следующего состава: 62.5 мМ Трис-НСl pH 8.0, 2.5% ДСН, 10% глицерин, 0.1 мМ EDTA, 0.02% бромфеноловый синий. Пробы обрабатывали при помощи ультразвука в течение 30 с, инкубировали при 98°C 5 мин.

Концентрирующий гель имел следующий состав: 2% акриламид, 0.17% бисакриламид, 0.125 мМ Трис-НСl pH 6.8, 0.1% ДСН, 0.06% персульфат аммония, 0.06% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Иммуноблоты получали как с разделяющего, так и с концентрирующего геля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГАФД влияет на процессы агрегатообразования в клеточных моделях болезни Хантингтона

В нашей работе анализировали функции трех белков – ГАФД, тТГ и БТШ70, в процессе агрегации мутантного хантингтина (модель БХ) и мутантной СОД1 (модель АБС). В качестве модели БХ использовали три клеточные линии – нейробластомы человека SK-N-SH, SH-SY-5Y и клетки эмбрионального мозга человека HNSC3148 [25]. Клетки трансфицировали плазмидой, содержащей экзон 1 гена Q103, слитый с геном EGFP. Через 12 ч после трансфекции в клетках появлялись небольшие, яркие пятна, которые в последующие 36 ч сливались в крупные флуоресцирующие комплексы размером более 100 нм (рис. 1А). Следу-

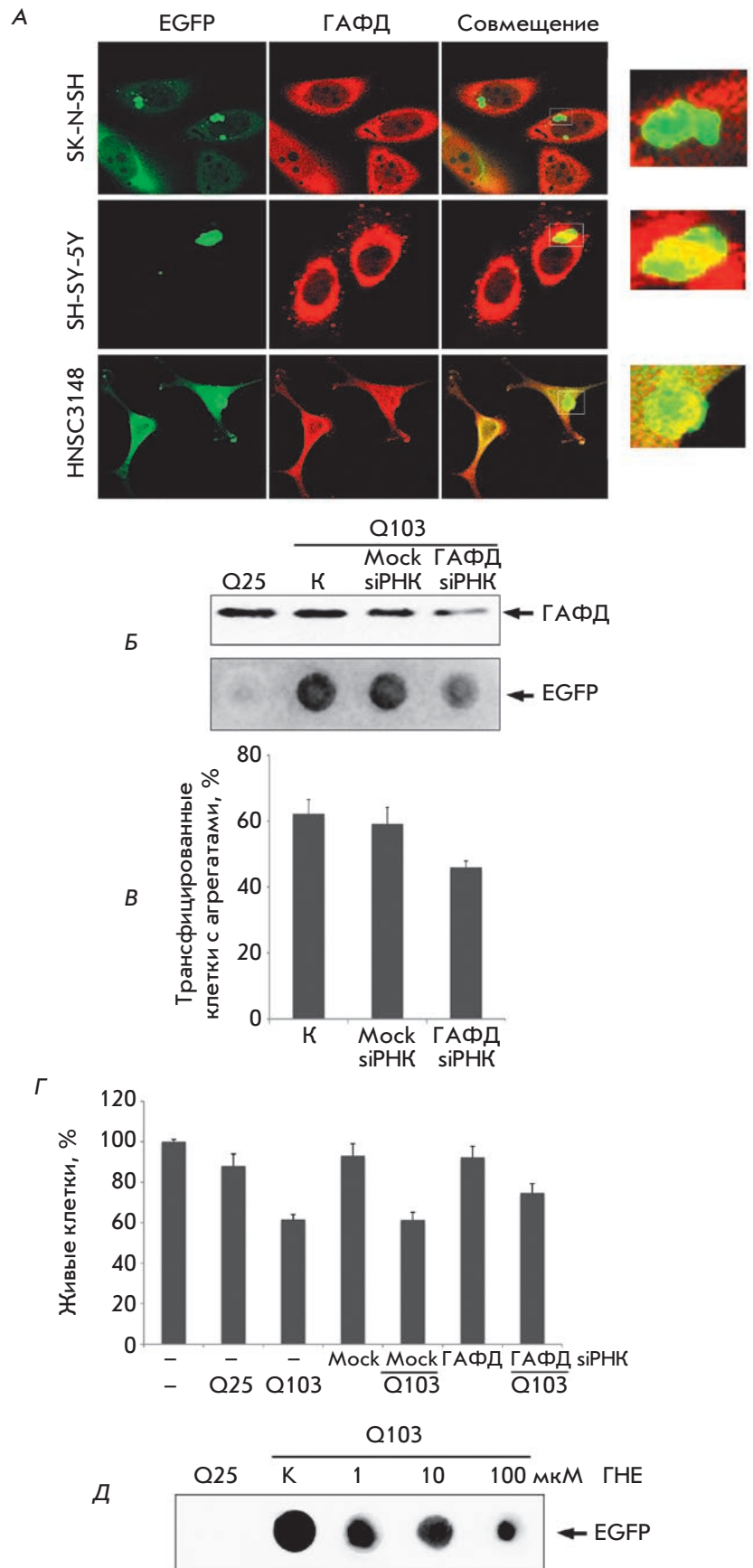
ет отметить, что картина формирования агрегатов была, несмотря на небольшие временные расхождения, одинаковой в клетках всех трех типов. Применяя специфические антитела, узнающие ГАФД, мы показали, что фермент локализуется с агрегированными цепями полиглутамина (рис. 1А).

Ранее было установлено, что в клетках нейробластомы SK-N-SH ГАФД концентрируется в местах появления олигомеров, а затем крупных агрегатов мутантного хантингтина [10]. Кроме того, этот фермент обнаружен в отложениях мутантного хантингтина на срезах мозга больных БХ [26]. Эти данные и тот факт, что подобная локализация наблюдается в эмбриональных клетках человека, говорят о распространенности явления и о том, что ГАФД, доля которого в составе клеточного белка достигает 2–4%, может влиять на формирование агрегатов в ходе развития БХ.

Влияние ГАФД на размер растущих агрегатов мутантного хантингтина мы оценивали с использованием снижения уровня этого белка с помощью siРНК. С этой целью клетки SK-N-SH за 1 сут до запуска процесса агрегации мутантного белка Q103 трансфицировали соответствующей siРНК. После подтверждения снижения уровня ГАФД определяли количество агрегированного материала. Согласно данным иммуноблоттинга применение такой технологии позволило на 50–60% уменьшить количество ГАФД в клетках нейробластомы человека SK-N-SH (рис. 1Б). Для изучения процесса агрегации мы использовали метод ловушки на фильтре. Этот метод позволяет определить, какое количество агрегированного материала, основную часть которого составляет полиглутаминовый повтор Q103 (модель БХ), остается на ацетат-целлюлозной мембране после пропускания через нее клеточных экстрактов, полученных с применением ДСН. Очевидно, что в экстракте контрольных клеток, не обработанных siРНК, обнаруживается значительное количество агрегатов (рис. 1Б). Действие неспецифической siРНК (Mock siРНК) не вызывало никаких изменений в процессе агрегации, тогда как специфическая siРНК, напротив, снижала количество агрегированных, нерастворимых в ДСН мутантных белков (рис. 1Б). Более того, подсчет числа трансфицированных клеток с агрегатами и диффузно распределенным белком показал, что при подавлении синтеза фермента число клеток, в которых сформировались агрегаты мутантного белка, снижается на 10% (рис. 1Б).

Предполагается, что между агрегацией мутантных белков и снижением жизнеспособности нейрональных клеток существует прямая связь. Поэтому мы оценили, как влияет подавление синтеза ГАФД и соответственно снижение уровня агрегации му-

Рис. 1. Влияние ГАФД на процесс агрегации мутантного хантингтина в клетках-моделях болезни Хантингтона. **А** – ГАФД локализуется в агрегатах мутантного хантингтина. Клетки нейробластомы SK-N-SH, SH-SY-5Y и эмбриональные клетки мозга человека, HNSC3148, трансфицировали плазмидой, содержащей ген мутантного хантингтина с повтором из 103 остатков глутамина, Q103, сшитый с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Через 48 ч клетки окрашивали антителами к ГАФД (вторичные антитела дают красную окраску). На вынесенном поле желтым окрашены места колокализации ГАФД и Q103 (изображения совмещены по каналам 488 и 543 нм). **Б** – Специфическое подавление экспрессии фермента с помощью siРНК (верхняя панель, siРНК ГАФД) приводит к снижению уровня агрегации Q103 в тесте ловушка на фильтре (нижняя панель), а также к (**В**) уменьшению доли трансфицированных клеток, содержащих агрегаты, и к (**Г**) повышению выживаемости клеток, трансфицированных Q103, по сравнению с контролем (**Б**, **В** – К – нетрансфицированные клетки). **Д** – Гидроксиноннаенал, ГНЕ, инактивирующий ГАФД, снижает количество агрегированного полиглутамина



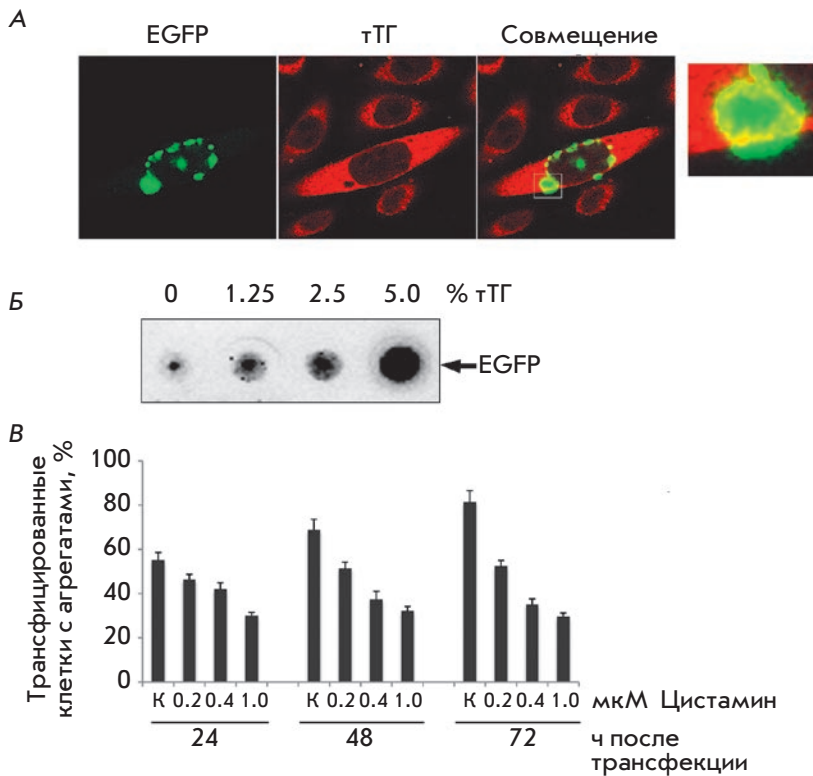


Рис. 2. Тканевая трансглутаминаза усиливает агрегацию мутантного хантингтина. **А** – tTG локализуется в агрегатах мутантного хантингтина. Q103, конъюгированный с EGFP, окрашен зеленым цветом, tTG – красным. На вынесенной панели область колокализации Q103 и tTG окрашена желтым. **Б** – Добавление tTG к экстракту клеток с полиглутамином увеличивает количество агрегированного материала в тесте ловушка на фильтре (количество tTG выражено в процентах от общего количества белка в экстракте). **В** – Ингибитор tTG, цистамин, подавляет процесс агрегации мутантного хантингтина в зависимости от концентрации ингибитора (К – цистамин не добавляли); по оси ординат отложено количество клеток с агрегатами, измеренное в определенный момент времени

тантного белка на количество выживших клеток. Эти эксперименты были поставлены так же, как и описанные выше, но жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода Мосмана через 48 ч после трансфекции siРНК, а затем конструкции, кодирующей полиглутаминовую последовательность (рис. 1Г). Показано, что экспрессия мутантного хантингтина действительно приводит к снижению числа жизнеспособных клеток на 40%. Предварительная трансфекция плазмидой с контрольной siРНК не влияет на выживаемость как контрольных, так и несущих Q103 клеток. Подавление синтеза ГАФД с помощью специфичной siРНК приводит к увеличению на 18% количества выживших клеток, экспрессирующих Q103, по сравнению с клетками с нормальным уровнем ГАФД (рис. 1Г).

Чтобы доказать значимость ГАФД как фармакологической мишени, мы провели литературный поиск низкомолекулярных соединений, обладающих сродством к ГАФД, и выявили несколько таких соединений, включая гидроксиноннал (ГНЕ). Известно, что ГНЕ способен реагировать с цистеиновыми и гистидиновыми остатками в молекуле фермента и вызывать его инактивацию [27]. ГНЕ вводили в культуру клеток нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих Q103, слитый с маркерным геном EGFP, после чего получали клеточный лизат и анализировали его с помощью метода ловушки на филь-

тре. Результаты таких опытов позволяют считать, что ГАФД действительно служит мишенью для малых молекул: степень агрегации комплекса мутантного хантингтина с ГАФД снижалась на 45–50% при воздействии ГНЕ в фармакологически релевантной концентрации (1 мкМ). Эта величина является удовлетворительным терапевтическим показателем, причем при увеличении концентрации соединения степень агрегации уменьшалась еще значительно (рис. 1Д). Эффект ГНЕ, с нашей точки зрения, основан на его способности отбирать часть молекул ГАФД из комплекса с мутантным хантингтином; процесс агрегации при этом должен затухать.

Таким образом, ГАФД локализуется в патогенных агрегатах вместе с мутантным хантингтином и, по-видимому, принимает активное участие в процессе агрегации на ее ранних этапах. В пользу такой трактовки результатов говорит тот факт, что специфическое снижение количества доступных для агрегации молекул фермента, достигаемое с помощью siРНК или высокоаффинного соединения, приводит к подавлению агрегации комплекса Q103–ГАФД.

Исследование влияния тканевой трансглутаминазы на агрегацию мутантного хантингтина

Агрегаты мутантного хантингтина, атаксина и некоторых других патогенных белков могут форми-

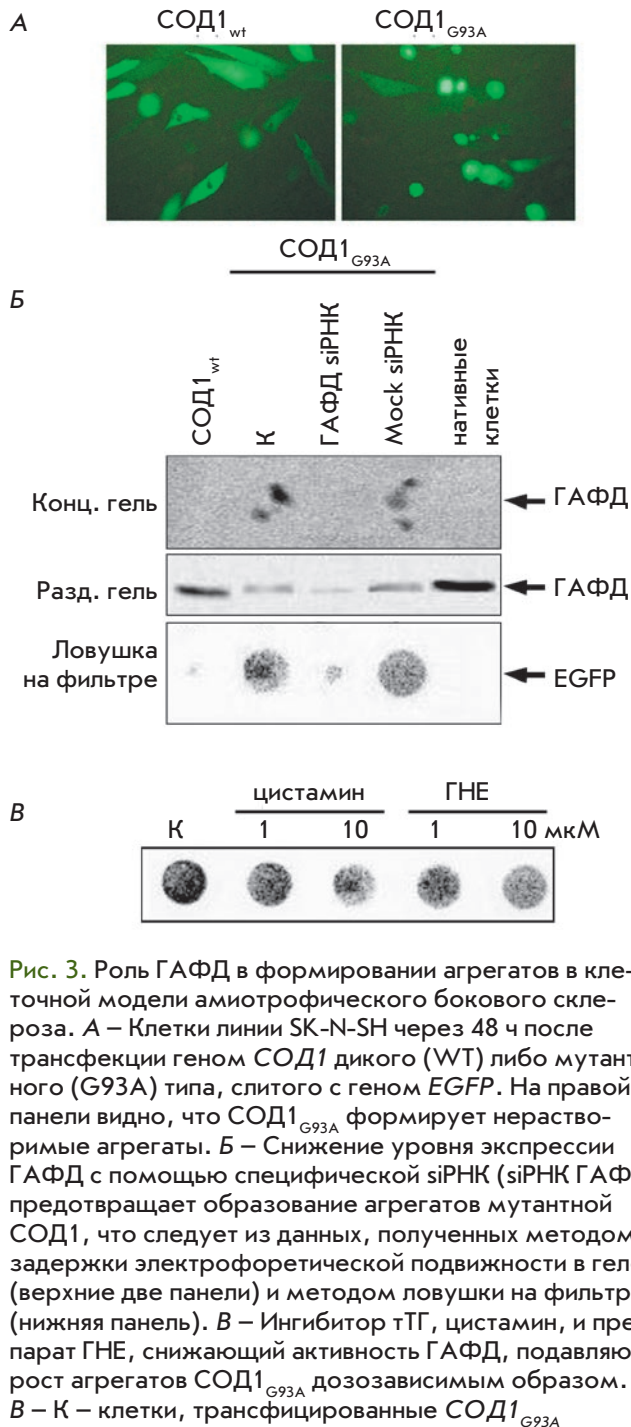


Рис. 3. Роль ГАФД в формировании агрегатов в клеточной модели амиотрофического бокового склероза. **А** – Клетки линии SK-N-SH через 48 ч после трансфекции геном *СОД1* дикого (WT) либо мутантного (G93A) типа, слитого с геном *EGFP*. На правой панели видно, что *СОД1*_{G93A} формирует нерастворимые агрегаты. **Б** – Снижение уровня экспрессии ГАФД с помощью специфической siРНК (siРНК ГАФД) предотвращает образование агрегатов мутантной *СОД1*, что следует из данных, полученных методом задержки электрофоретической подвижности в геле (верхние две панели) и методом ловушки на фильтре (нижняя панель). **В** – Ингибитор тТГ, цистамин, и препарат ГНЕ, снижающий активность ГАФД, подавляют рост агрегатов *СОД1*_{G93A} дозозависимым образом. **Б, В** – К – клетки, трансфицированные *СОД1*_{G93A}

роваться в результате сшивания аномально длинных полиглутаминовых цепей с белками-донорами реактивных лизинов, в частности ГАФД, в процессе, катализируемом тТГ [9, 28]. С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии мы определили локализацию тТГ в клетках, экспрессирующих *Q103*, чтобы понять роль этого фермента в нашей клеточ-

ной модели. Оказалось, что молекулы тТГ равномерно распределены по цитоплазме клетки, а вокруг агрегатов *Q103*–ГАФД наблюдаются скопления фермента. Можно видеть, что тТГ колокализуется с мутантным хантингтином (рис. 2А). Участие тТГ в образовании агрегатов мы подтверждали, вводя очищенный фермент в экстракт клеток, трансфицированных конструкцией *Q103*–*EGFP*, до того, как началось формирование агрегатов. Как показывает анализ агрегации *ex vivo* (см. «Экспериментальную часть»), проведенный с применением метода ловушки на фильтре, добавление тТГ дозозависимым образом увеличивает количество *Q103*, нерастворимого в ДСН и остающегося на мембране (рис. 2Б).

Насколько подавление активности тТГ отразится на процессе образования агрегатов? Чтобы ответить на этот вопрос, мы инкубировали клетки SK-N-SH с известным ингибитором фермента, цистамином, начиная с момента начала агрегации, т.е. через 5 ч после трансфекции геном *Q103*–*EGFP*. Подсчет числа клеток с агрегатами показал, что действие цистамина проявляется уже через 24 ч после начала инкубации; через 1 сут влияние ингибитора становится еще более выраженным. Наконец, подсчет числа клеток через 3 сут после внесения ингибитора в среду показывает, что цистамин в концентрации 0.4 мкМ снижает число клеток с агрегатами *Q103*–*EGFP* более чем наполовину, а дальнейшее увеличение концентрации ингибитора подавляет агрегацию еще сильнее (рис. 2В). Интересно, что при использовании цистамина в концентрации 1 мкМ доля клеток с агрегатами не изменялась с течением времени и составляла 25–28% от всего количества трансфицированных клеток. В популяции необработанных клеток доля клеток, содержащих агрегаты, росла и через 72 ч после трансфекции составляла 82%. Это может говорить о том, что образование полиглутаминовых агрегатов обусловлено не только действием тТГ, но, возможно, и другим механизмом, таким, например, как в модели «polar zipper» [3].

Участие ГАФД и тТГ в процессах формирования агрегатов мутантной *СОД1*

Предполагая, что ГАФД и тТГ способствуют агрегации не только хантингтина, но и других мутантных белков, мы провели анализ функций этих ферментов в формировании агрегатов на примере клеточной модели АБС. С этой целью использовали плазмиды, содержащие гены *СОД1*_{G93A} и *СОД1*_{wt}, слитые с геном зеленого флуоресцентного белка. Микроскопический анализ клеток нейробластомы SK-N-SH, трансфицированных этими плазмидами, показал, что мутантная *СОД1*_{G93A}, в отличие от *СОД1*_{wt}, способна формировать агрегаты в течение 36–48 ч (рис. 3А).

Играет ли ГАФД в формировании агрегатов мутантной СОД1 такую же роль, как и в модели БХ? Чтобы понять это, мы применили технологию специфических малых интерферирующих РНК. Лизаты клеток SK-N-SH, трансфицированных одновременно специфической или контрольной siРНК и СОД1_{wt} или СОД1_{G93A}, анализировали методом задержки электрофоретической подвижности в геле и иммуноблоттинга, а также методом ловушки на фильтре (рис. 3Б).

Как следует из результатов электрофоретического анализа, лизат клеток, обработанных специфической siРНК, содержит значительно меньше ГАФД, способной проходить в разделяющий гель, чем лизаты контрольных (интактных) клеток, и клеток, несущих СОД1_{wt} (рис. 3Б, средняя панель). Как в контрольных, так и в трансфицированных Mock siРНК клетках, несущих мутантную СОД1, уровень ГАФД, проходящей в разделяющий гель, понижен. Однако именно в лизатах из таких клеток содержится значительное количество агрегатов, задерживающихся в концентрирующем геле (рис. 3Б, верхняя панель). Эти результаты подтверждаются и в опыте с применением метода ловушки на фильтре; в лизатах таких клеток выявлены агрегаты мутантной СОД1 (рис. 3Б, нижняя панель), в состав которых, видимо, входит и ГАФД.

Кроме специфической siРНК, для подавления ГАФД использовали ГНЕ. Как показано методом ловушки на фильтре, ГНЕ в концентрации 1 мкМ подавлял агрегацию мутантной СОД1; повышение концентрации ГНЕ до 10 мкМ приводило к еще более выраженному эффекту (рис. 3В). Влияние ГНЕ можно объяснить тем, что при АБС, как и при многих других патологических процессах, усиливается образование свободных радикалов, а окислительный стресс вызывает нарушение структуры ГАФД. При этом экспонируются участки молекулы фермента, которые связываются с мутантными белками, что приводит к образованию крупных комплексов [29]. Мы предполагаем, что ГНЕ препятствует формированию подобных комплексов, т.е. ингибирует агрегацию СОД1.

Участие тТГ в формировании агрегатов СОД1-ГАФД показано также с помощью ингибиторного анализа. Используя цистамин, мы установили, что подавление активности тТГ уменьшает массу агрегирующего материала на фильтре. Однако такой эффект достигается при высоких концентрациях цистамина (не ниже 10 мкМ), превышающих фармакологические значения (рис. 3В). Подавление агрегации мутантной СОД1 при использовании цистамина объяснить труднее. Возможно, ингибирование тТГ предотвращает образование ковалентных связей как между молекулами ГАФД, так и между ГАФД и другими белками.

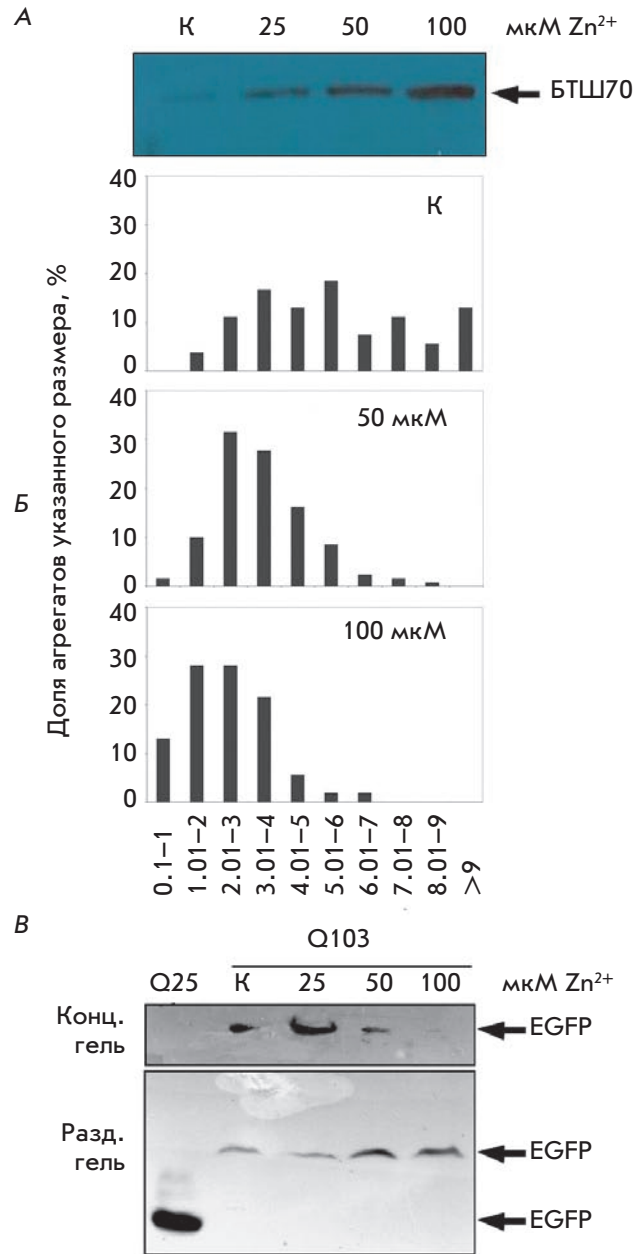


Рис. 4. БТШ70 препятствует формированию агрегатов мутантного хантингина в клеточной модели болезни Хантингтона. А – Содержание шаперона в клетках SK-N-SH увеличивается в зависимости от концентрации сульфата цинка (К – без сульфата цинка). Б – Гистограммы распределения агрегатов Q103 по размеру (в мкм) в зависимости от концентрации сульфата цинка и соответственно количества БТШ70 в клетках. В – Дробное увеличение экспрессии БТШ70 в клетках нейробластомы SK-N-SH, трансфицированных Q103, приводит к снижению агрегированного полиглутамина в тесте ловушка на фильтре. На Б и В: К – сульфат цинка не добавляли

Шаперон БТШ70 подавляет агрегацию мутантного хантингтина в клеточной модели БХ

В предотвращении образования комплексов поврежденных или мутантных полипептидов значительную роль играет шаперон БТШ70 [30]. Влияние БТШ70 на агрегацию мутантного хантингтина мы изучали с использованием в качестве модели клеток нейробластомы человека SK-N-SH, трансфицированных геном *БТШ70* под контролем индуцибельного металлотионеинового промотора. Экспрессию *БТШ70* индуцировали солью цинка ($ZnSO_4$), при помощи которой можно дозозависимым образом повышать уровень белка (рис. 4А), за 6 ч до трансфекции клеток SK-N-SH плазмидой, несущей ген *Q103*. Диаметр агрегатов мутантного хантингтина определяли через 48 ч после трансфекции. Средний диаметр агрегатов в трансфицированных клетках, обработанных 50 мкМ $ZnSO_4$, составил 3.15 ± 0.69 мкм, в то время как в контрольных клетках диаметр агрегатов был равен 6.82 ± 0.98 мкм. При повышении концентрации $ZnSO_4$ до 100 мкМ наблюдалось дальнейшее снижение и числа клеток, несущих агрегаты, и размеров агрегатов (средний диаметр равен 1.52 ± 0.19 мкм, рис. 4Б). Влияние БТШ70 на количество агрегирующего материала мы анализировали с помощью метода ловушки на фильтре. Оказалось, что при повышении концентрации $ZnSO_4$ и соответственно уровня БТШ70 снижается количество задержанного на поверхности фильтра материала, содержащего EGFP-маркер (рис. 4В).

Участие молекулярных шаперонов, особенно БТШ70, в предотвращении формирования агрегатов патогенных или поврежденных белков известно, однако, механизмы этого эффекта до сих пор остаются невыясненными. В этой связи интересны данные о том, что шаперон образует комплекс с агрегирующими моно- и олигомерами мутантного хантингтина [31]. Этот комплекс носит динамический характер. Предполагается, что БТШ70 препятствует включению

полиглутаминовых молекул в образующиеся агрегаты мутантного хантингтина. Однако результаты нашей недавно опубликованной работы [10] говорят о том, что БТШ70 действует не только на мутантный хантингтин, но и на молекулы ГАФД, которые многократно усиливают агрегацию. Исходя из представленных результатов, можно предположить, что, по крайней мере в клетках-моделях БХ, БТШ70 способен препятствовать образованию комплекса полиглутамин-ГАФД, защищая фермент от сшивающего действия тТГ. Эта гипотеза не противоречит теориям о роли шаперонов в защите клеток от нейропатогенных стимулов, однако, безусловно нуждается в тщательной проверке.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе с использованием клеточных моделей болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза установлено, что помимо самих патогенных белков, специфичных для указанных заболеваний, большое значение имеют два фермента – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа и тканевая транслгутаминаза. Первый фермент участвует в формировании комплексов с патогенными белками в обеих моделях данных заболеваний; его блокада приводит к снижению темпов агрегации. Транслгутаминаза, по-видимому, катализирует образование комплекса ГАФД с патогенными клеточными белками. Фактором, предотвращающим агрегацию, является шаперон БТШ70, повышение экспрессии которого дозозависимым образом снижает патогенные проявления. На основании полученных данных мы утверждаем, что все три белка могут рассматриваться в качестве перспективных фармакологических мишеней. ●

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ (гранты № 11-04-12047-офи_м и 12-08-31523).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Margulis B., Kinev A., Guzhova I. Heat Shock Proteins in Biology and Medicine. Kerala, India: Research Signpost, 2006. P. 305–329.
- Evert B.O., Wüllner U., Klockgether T. // Cell Tissue Res. 2000. V. 301. № 1. P. 189–204.
- Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 12. P. 5355–5358.
- Bence N.F., Sampat R.M., Kopito R.R. // Science. 2001. V. 292. № 5521. P. 1552–1555.
- Kahlem P., Terre C., Green H., Djian P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 25. P. 14580–14585.
- Fischbeck K.H. // Brain Res. Bull. 2001. V. 56. P. 161–163.
- Cooper A.J., Sheu K.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Gentile V., Peluso G., Blass J.P. // J. Neurochem. 1999. V. 72. P. 889–899.
- Lai T.S., Tucker T., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenberg C.S. // J. Neurochem. 2004. V. 88. № 5. P. 1253–1260.
- Orru S., Ruoppolo M., Francese S., Vitagliano L., Marino G., Esposito C. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 137–146.
- Guzhova I.V., Lazarev V.F., Kaznacheeva A.V., Ippolitova M.V., Muronetz V.I., Kinev A.V., Margulis B.A. // Hum. Mol. Genet. 2011. V. 20. № 20. P. 3953–3963.
- Wang Q., Woltjer R.L., Cimino P.J., Pan C., Montine K.S., Zhang J., Montine T.J. // FASEB J. 2005. V. 19. P. 869–871.
- Tsuchiya K., Tajima H., Kuwae T., Takeshima T., Nakano T., Tanaka M., Sunaga K., Fukuhara Y., Nakashima K., Ohama E., et al. // Eur. J. Neurosci. 2005. V. 21. № 2. P. 317–326.
- Butterfield D.A., Hardas S.S., Lange M.L. // J. Alzheimers

- Dis. 2010. V. 20. № 2. P. 369–393.
14. Oster C., Pagnini F. // *Front. Psychol.* 2012. V. 3. A. 530.
15. Al-Chalabi A., Jones A., Troakes C., King A., Al-Sarraj S., van den Berg L.H. // *Acta Neuropathol.* 2012. V. 124. № 3. P. 339–352.
16. Kobayashi Y., Kume A., Li M., Doyu M., Hata M., Ohtsuka K., Sobue G. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 12. P. 8772–8778.
17. Muchowski P.J., Wacker J.L. // *Nat. Rev.* 2005. V. 6. P. 11–22.
18. Jana N.R., Tanaka M., Wang G. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 13. P. 2009–2018.
19. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. // *Science.* 2002. V. 295. № 5561. P. 1852–1858.
20. Ben-Zvi A., De Los Rios P., Dietler G., Goloubinoff P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 36. P. 37298–37303.
21. Тихонова Н.С., Москалева О.С., Маргулис Б.А., Гужова И.В. // *Цитология.* 2008. Т. 50. № 5. С. 467–472.
22. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
23. Bradford M.A. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
24. Novoselova T.V., Margulis B.A., Novoselov S.S., Sapozhnikov A.M., van der Spuy J., Cheetham M.E., Guzhova I.V. // *J. Neurochem.* 2005. V. 94. № 3. P. 597–606.
25. Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A., Revishchin A.V., Korochkin L.I., Sukhikh G.T. // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2002. V. 134. № 1–2. P. 149–154.
26. Kish S.J., Lopes-Cendes I., Guttman M., Furukawa Y., Pandolfo M., Rouleau G.A., Ross B.M., Nance M., Schut L., Ang L., et al. // *Arch. Neurol.* 1998. V. 55. № 10. P. 1299–1304.
27. Uchida K., Stadtman E.R. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 9. P. 6388–6393.
28. Cooper A.J., Sheu K.R., Burke J.R., Onodera O., Strittmatter W.J., Roses A.D., Blass J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 23. P. 12604–12609.
29. Naletova I., Schmalhausen E., Kharitonov A., Katrukha A., Saso L., Caprioli A., Muronetz V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 12. P. 2052–2058.
30. Meriin A.B., Sherman M.Y. // *Int. J. Hyperthermia.* 2005. V. 21. № 5. P. 403–419.
31. Muchowski P.J., Schaffar G., Sittler A., Wanker E.E., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 14. P. 7841–7846.

УДК 57.088.5

Идентификация новых ингибиторов киназной активности IGF1R методами молекулярного моделирования и высокоэффективного скрининга

Р. Морев¹, А. Васильченко¹, М. Платонов¹, А. Григоренко^{1,2}, Е. Волкова¹, С. Зозуля^{1*}¹Енамин, 02094, Киев, ул. Красноткацкая, 78, Украина²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, 01601, Киев, ул. Владимирская, 64, Украина

*E-mail: s.zozulya@enamine.net

Поступила в редакцию 04.12.2012

РЕФЕРАТ Проведен поиск низкомолекулярных ингибиторов киназной активности рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R), представленных новыми хемотипами, которые могут быть использованы для создания лекарственных средств, превосходящих известные экспериментальные блокаторы IGF1R. С помощью виртуального скрининга с использованием методов молекулярного моделирования и докинга, а также лиганд-ориентированного фармакофорного подхода созданы сфокусированные библиотеки веществ. Способность отобранных в результате молекулярного моделирования соединений ингибировать активность IGF1R-киназы проверена экспериментально с использованием высокоэффективного биохимического скрининга. Найдены новые хемотипы ингибиторов IGF1R, которые могут стать основой для разработки высокоэффективных терапевтических средств, подавляющих активность IGF1R.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рецептор инсулиноподобного фактора роста-1, ингибитор киназной активности, противоопухолевые средства, высокоэффективный скрининг, виртуальный скрининг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ADP – аденозиндифосфат; ATP – аденозинтрифосфат; IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста-1; InsR – рецептор инсулина; ВЭС – высокоэффективный скрининг.

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) принадлежит к классу трансмембранных рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью. IGF1R широко представлен в различных клетках и тканях большинства позвоночных, это ключевой регулятор роста как в ходе развития, так и во взрослом организме. Филогенетически IGF1R очень близок к рецептору инсулина (InsR), который регулирует гомеостаз углеводов, а также метаболизм жиров и белков. Эукариотические IGF1R и InsR имеют около 60% гомологии на уровне полной аминокислотной последовательности и более 90% в зоне каталитических доменов.

Сигнальный путь IGF1R вовлечен в патогенез онкологических заболеваний. Так, высокий уровень IGF1R, его лигандов IGF-1 и IGF-2 и/или аутокринная активация этого сигнального пути характерны для рака молочной и предстательной железы, печени, легких, мочевого пузыря, щитовидной железы, почек, саркомы Юинга, рабдомиосаркомы, лимфом, лейкозов, множественной миеломы и т.д.

[1–3]. IGF1R необходим для трансформации клеток онкогенами, повышение его уровня может привести к лиганд-зависимой злокачественной трансформации клеток и образованию опухолей [4]. Случаи гиперактивации мутантных форм IGF1R как причины опухолевого роста до сих пор не описаны, что противоречит классическим механизмам онкогенеза с участием большинства других тирозинкиназ. При ингибировании IGF1R снижается пролиферативная активность клеток, а также развивается проапоптотический эффект. IGF1R экспрессируется в опухолевых клетках различного типа, что позволяет рассматривать его в качестве потенциальной мишени для комбинированной противоопухолевой терапии. Роль сигнального пути IGF в канцерогенезе подтверждена экспериментально, поэтому разработка стратегий, в основе которых лежит подавление активности IGF1R как низкомолекулярными ингибиторами киназы, так и моноклональными антителами, находится в фокусе исследований многих фармацевтических и биотехнологических компаний в течение последних 10–15 лет. Не менее 10 низко-

молекулярных и белковых ингибиторов IGF1R проходят поздние доклинические либо клинические испытания.

Каталитические домены IGF1R и InsR обладают высоким сходством, поэтому практически все известные низкомолекулярные ингибиторы IGF1R в значительной степени подавляют и активность InsR. Подобные низкоселективные ингибиторы могут влиять на гомеостаз глюкозы, приводя к гипергликемии с высокой вероятностью развития диабетических состояний. Гипергликемические эффекты низкомолекулярных ингибиторов IGF1R действительно наблюдали в ходе доклинических, а в последние годы и клинических испытаний, что вызвало сомнения в возможности их успешного применения в клинической практике. В последнее десятилетие очевидная проблема селективности малых молекул – ингибиторов IGF1R, привела к определенному сдвигу интересов ученых в направлении белковых ингибиторов IGF1R или антител, высокоспецифичных к рецептору либо его лигандам. Однако, поскольку сигнальные пути IGF1R и InsR в существенной степени пересекаются, присущая ингибиторам IGF1R способность частично подавлять и рецептор инсулина может быть полезной при использовании таких соединений в качестве противоопухолевых средств [5, 6]. С другой стороны, необходимо отметить, что соединения, высокоселективно подавляющие активность IGF1R *in vitro*, совсем не обязательно проявляют подобную селективность в организме. Так, оказалось, что ряд активных и высокоселективных *in vitro* терапевтических антител против IGF1R вызывают гипергликемию и проявляют низкую терапевтическую эффективность в поздних доклинических и клинических испытаниях [4, 7]. Отсутствие у высокоселективных *in vitro* ингибиторов IGF1R способности ингибировать данный рецептор *in vivo* можно объяснить перекрестной активацией рецептора IGF-1 инсулином (и наоборот), связыванием антител к IGF1R с гетеродимерами IGF1R-InsR, а также действием таких компенсаторных механизмов, как индукция экспрессии InsR или биосинтеза IGF-1 и инсулина при снижении количества IGF-1/IGF1R в организме [7, 8]. Кроме проблем, связанных с селективностью, существуют и механизмы, определяющие резистентность к терапии, направленной на IGF1R, что может привести к необходимости коингибирования других молекулярных мишеней для достижения эффективности [9].

Таким образом, можно сказать, что, несмотря на многочисленные экспериментальные данные, указывающие на IGF1R как на перспективную мишень для противоопухолевой терапии, а также на многолетние поиски эффективных блокаторов сигнального

пути IGF1R различной природы и механизмов действия, результаты клинических испытаний на сегодняшний день не вызывают оптимизма [7, 10]. Поэтому поиск клинически более эффективных ингибиторов IGF1R, включая и малые молекулы, остается актуальной задачей. Предполагается, что новые ингибиторы могут отличаться от уже известных механизмом действия, коингибированием других мишеней, лучшей органо- и тканеселективностью распределения, фармакодинамическими свойствами и соотношением селективности ингибирования IGF1R и InsR.

В результате скрининга 2935 химических соединений, отобранных путем как лиганд-, так и мишень-ориентированного виртуального скрининга, в представленной работе найдено несколько низкомолекулярных ингибиторов IGF1R. Эти вещества отличаются от описанных ранее структурно, что наряду с параметрами их активности и селективности делает возможной разработку на основе данных хемотипов клинически конкурентоспособных противоопухолевых соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты

Все реагенты для скрининга, включая универсальный тест-набор для определения активности киназ ADP-Glo™ Kinase Assay (Кат. V9401), а также тест-системы для отдельных киназ – IGF1R (Кат. V3581), InsR (Кат. V9411), Met (Кат. V3361), Syk (Кат. V3801) и Btk (Кат. V2941), предоставлены компанией Promega Corp. (Мэдисон, Висконсин, США) и использовались согласно инструкциям производителя. Стандартные ингибиторы киназ PQ401 (Кат. P0113), AG538 (Кат. T7697), стауроспорин (Кат. S5921), а также натриевая соль поли-(Glu4,Tyr1) (Кат. P0275) и диметилсульфоксид (ДМСО) (Кат. 41640) были производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Белые 384-луночные планшеты для малых объемов с U-образным дном (Кат. 3673) производства Corning (Лоуэлл, Массачусетс, США) использовали при применении люминесцентных методов детекции. Роботизированные автоматические жидкостные дозаторы на 96 и 384 канала (Кат. 5316) произведены Thermo Scientific/Matrix (Гудзон, Нью-Гэмпшир, США). Полипропиленовые 384-луночные планшеты с V-образным дном (Кат. 784201) производства Greiner Bio-One (Монро, Северная Каролина, США) и 96-луночные планшеты производства Matrix (Кат. 4271) или подобные им использовали для хранения и растворения веществ. Реагенты и буферные растворы хранили в одноразовых резервуарах (Кат. N372790) производства Beckman Coulter (Индианаполис, Индиана, США).

Все исследуемые соединения получены из компании Enamine, Ltd. (www.enamine.net, Киев, Украина) в виде замороженных 10-мМ растворов в ДМСО в запечатанных 96- или 384-луночных полипропиленовых планшетах.

Молекулярное моделирование и хемоинформатика

Все расчеты были осуществлены с использованием пакета программного обеспечения QXP/Flo+ разработки McMartin и др. [11]. Использовали кластер конфигурации HPC Linux (164 CPU ядер в пяти нодках). Всю работу с химическими структурами веществ и базами данных проводили с использованием программы Instant JChem (ChemAxon, версия ПО 5.10.1).

Высокоэффективный скрининг (ВЭС)

Высокоэффективный скрининг на мишени IGF1R осуществляли с использованием коммерческих наборов для определения активности киназ ADP-Glo™ Kinase Assay и IGF1R-киназы (Promega). Киназные реакции (конечный объем 7 мкл) проводили в 384-луночном планшете. Роботизированные пипетки PlateMate Plus использовали для разведений и добавления всех реагентов. Так, каждая лунка планшета содержала 3 мкл смеси фермент/субстрат (1 мкг субстрата (пептид IGF1Rtide) и 4 нг рекомбинантной IGF1R-киназы) в 0.66-кратном реакционном буфере. Однократный буфер содержал 40 мМ Трис-НСI; 20 мМ хлорида магния; 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 2 мМ хлорида марганца и 250 мкМ дитиотреитола (ДТТ). Перед добавлением к киназной смеси стоковые 10-мМ растворы веществ в ДМСО разбавляли ДМСО до 2 мМ, после чего аликвоты разведений (3 мкл) переносили в реакционный буфер (83 мкл) и перемешивали. По 2 мкл полученных водных растворов соединений переносили в соответствующие лунки до конечной концентрации вещества в 20 мкМ и 1% ДМСО в реакционной смеси. Планшеты преинкубировали в течение 10 мин при 27°C и перемешивании при 300 об/мин. Киназную реакцию запускали, добавляя 2 мкл раствора АТР, при этом рабочая концентрация АТР составляла 50 мкМ. Через 90 мин (27°C, 300 об/мин) в реакционную смесь добавляли 7 мкл реагента ADP-Glo, инкубировали в течение 40 мин и добавляли реагент для детекции (14 мкл). После заключительной инкубации (20 мин, 27°C) люминесценцию измеряли на спектрофотометре-ридере PolarStar Omega (время интегрирования – 0.2 с, усиление сигнала = 3500).

Соединения тестировали в четырех или двух повторностях. В каждом планшете использовали контрольный ингибитор стауроспорин в четырех повторностях (2 мкМ). В колонках 1, 2 каждого планшета

смесь киназа/субстрат и тестируемые соединения заменяли 0.66-кратным буфером и однократным буфером с ДМСО (конечная концентрация ДМСО – 1%) соответственно для создания позитивного контроля. Колонки 23, 24 также не содержали соединений (вместо них добавляли однократный буфер с ДМСО) и считали их негативным контролем. Перед тем как приступить к определению селективности ингибирования и зависимости доза–эффект, все хиты, обнаруженные в первичном скрининге, вторично проверяли в тех же условиях. Стоковые растворы повторно тестируемых соединений готовили заново из независимых сухих навесок для исключения ошибок при взвешивании (подтверждение «из порошков»).

Оборудование для скрининга и анализ данных

При подготовке образцов для скрининга использовали роботизированные 96- или 384-канальные пипетки PlateMate Plus, применяемые в высокоэффективном режиме, или многоканальные электронные пипетки Matrix Impact (Thermo Scientific, Гудзон, Нью-Гэмпшир, США). Данные высокоэффективного скрининга (ВЭС), а также исследований селективности ингибирования киназ и зависимостей доза–эффект (IC_{50}) для наиболее сильных ингибиторов получены методом люминесцентной детекции с использованием планшетных ридеров PolarStar Omega (BMG Labtech, Ортенберг, Германия) и SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp., Саннивейл, Калифорния, США).

Данные об активности киназ с детекцией в системе ADP-Glo, полученные с планшетных ридеров, выражали в условных единицах люминесценции (у.е.л.). Относительную киназную активность рассчитывали, используя следующую формулу: Активность, % = $100 \times (\text{люминесценция исследуемого образца} - \text{среднее значение люминесценции для негативного контроля (без киназы)}) / (\text{среднее значение люминесценции для позитивного контроля (киназа без ингибитора)} - \text{среднее значение люминесценции для негативного контроля})$. Фактор Z' – показатель достоверности и воспроизводимости ВЭС – определяли, используя следующую формулу:

$$Z' = 1 - [3 \times (SD_{\text{образец}} + SD_{\text{контроль}}) / |M_{\text{образец}} - M_{\text{контроль}}|] \quad [12],$$

где SD – стандартное отклонение, M – среднее значение люминесцентного сигнала для образца и контроля соответственно. Результаты скрининга обрабатывали с использованием шаблонов Microsoft Excel, разработанных для подсчета уровня ингибирования, Z'-фактора, а также программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Калифорния,

США) для визуализации кривых зависимостей доза–эффект (IC_{50}). Кривые зависимости доза–эффект, представленные в процентах активности соответствующей киназы, были построены и аппроксимированы при использовании программы Prism, где показатели максимальной и минимальной активности были приведены к 100 и 0% соответственно. Перед началом высокоэффективного скрининга условия проведения экспериментов были оптимизированы и валидированы, в частности, определены процент превращения АТФ (не превышал 20%), приемлемое «окно эксперимента» (соотношение сигнал/фон) – как минимум 6, приемлемый Z'-фактор – не менее 0.6, а также воспроизводимость скрининга изо дня в день и от планшета к планшету. Первичный скрининг проводили при концентрации исследуемых соединений, равной 20 мкМ; далее некоторые слабые хиты (соединения, показавшие активность в тест-системе) тестировали дополнительно, используя более высокие их концентрации (40 или 80 мкМ). Статистически значимым хитом считали соединение, активность которого в первичном скрининге была как минимум на три стандартных отклонения ниже, чем среднее значение активности соединений по планшету (не принимая во внимание контроль). Графики Лайнуивера–Берка строили в Excel или Prism с использованием стандартных алгоритмов [13]. Оптимизацию и валидацию тест-системы для высокоэффективного скрининга и сам скрининг проводили согласно общим положениям и инструкциям, опубликованным на сайте Национального центра химической геномики США (NCGC Assay Guidance Manual and High-throughput Assay Guidance Criteria, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>).

Кривые зависимости доза–эффект (IC_{50}) и исследование селективности ингибирования

Селективность ингибирования отобранных хитов проводили на панели киназ Met, Syk, Btk, InsR при одной фиксированной концентрации ингибитора (за исключением InsR – в данной тест-системе изучали также зависимость доза–эффект). Ферментативную реакцию всех перечисленных киназ проводили в кинетических условиях, близких к описанным для IGF1R. Во всех случаях эффективность киназной реакции определяли люминесцентным методом с использованием набора ADP-Glo (Promega).

Зависимость доза–эффект и значения IC_{50} для подтвержденных хитов определяли с использованием IGF1R- и InsR-киназ. Условия эксперимента были близкими к условиям при ВЭС, за исключением того, что соединения добавляли к планшетам в формате восьмиточечных серийных разведений 1 : 2, начиная с высшей концентрации (100 мкМ), при постоянной

конечной концентрации ДМСО (1%) и в четырех повторях. Реакции для обеих киназ проводили при 27°C в присутствии 500 мкМ ДТТ, в разных экспериментах время инкубации составляло 2.5 или 4.5 ч. Использовали 4 и 2 нг киназы IGF1R и InsR на лунку соответственно. Обычно двукратные серийные разведения стоковых растворов делали сначала в чистом ДМСО, начиная с 10 мМ и заканчивая 19.5 мкМ, что соответствовало рабочим концентрациям от 100 до 0.019 мкМ в реакционном буфере с 1% содержанием ДМСО после переноса.

Количество киназ Met, Syk и Btk в реакциях определяли таким образом, чтобы превращение АТФ в АДФ в выбранных условиях не превышало 20%. Соотношение сигнал/фон в тест-системах для данных киназ составляло 3–5. Объем киназной реакции для Met, Syk и Btk (5 мкл) получали последовательным смешением 2 мкл раствора фермента (6, 8 и 4 нг фермента на лунку соответственно), 1 мкл водного раствора вещества в двукратном буфере (5% ДМСО) и 2 мкл смеси АТФ/субстрат поли-(Glu4,Tyr1) в 0.5-кратном буфере. Содержание АТФ и субстрата в рабочем растворе – 50 мкМ и 0.2 мг/мкл соответственно. Состав однократного буфера для киназ – 40 мМ Трис-НСl, 20 мМ хлорида магния, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2 мМ хлорида марганца (только для Btk) и 500 мкМ ДТТ, рН 7.5. При изучении селективности использовали соединения в концентрации 40 мкМ. В каждом опыте по шесть лунок отводили под положительный и отрицательный контроль, еще в шесть лунок вместо соединения добавляли стауроспорин (0.5–1 мкМ). Все соединения проверяли в четырех–шести повторностях. Время инкубации киназы, субстрата и ингибиторов перед добавлением АТФ составляло 20 мин (25°C), ферментативная реакция продолжалась 25 мин (37°C). После этого в реакционную смесь добавляли 5 мкл реагента ADP-Glo, а через 40 мин – реагент для детекции (10 мкл). После 30 мин инкубации (25°C) люминесценцию измеряли на спектрофотометре PolarStar Omega (время интегрирования – 0.5 с, усиление сигнала = 4095).

Кинетика ферментативной реакции, уравнение Михаэлиса–Ментен

В координатах Лайнуивера–Берка строили графики для наиболее эффективных ингибиторов L1 и T4. С этой целью активность данных ингибиторов проверяли при разных концентрациях субстрата и АТФ в тест-системе IGF1R-киназы.

При изучении конкуренции ингибиторов с АТФ использовали соединение L1 (100, 50, 25, 12 и 0 мкМ) в комбинации с АТФ в восьми разных концентрациях (от 519 до 4 мкМ). Соединение T4 тестировали

в таких же концентрациях, как и L1, в присутствии АТФ в диапазоне от 1 мМ до 8 мкМ (восемь концентраций). В качестве субстрата использовали пептид IGF1Rtide (143 мкг/мл). Значения во всех точках определяли в четырех повторностях. Содержание киназы IGF1R в лунке составляло 1 нг, концентрация ДТТ – 500 мкМ; реакция продолжалась в течение 4 ч при 27°C. При построении графиков для L1 с целью лучшей линейной аппроксимации учитывали только шесть концентрационных точек АТФ.

При изучении конкуренции ингибитор/субстрат использовали восемь двукратных разведений субстрата поли-(Glu4, Tyr1) – от 0.9 до 114.3 мкМ, принимая среднюю молекулярную массу субстрата за 12.5 кДа. L1 тестировали при 50, 25, 0 мкМ и T4 – при 50, 12.5, 0 мкМ. Концентрация АТФ в киназной реакции – 250 мкМ, ДТТ – 250 мкМ, IGF1R – 2 нг на лунку. При построении графиков учитывали только пять концентрационных точек субстрата, попадающих в линейный диапазон. Во всех экспериментах перед добавлением АТФ реакционную смесь инкубировали в течение 20 мин при 27°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Виртуальный скрининг. Мишень-ориентированная выборка

Общей концепцией этой работы было применение стратегии рационального скрининга, опирающейся на итеративный скрининг небольших фокусированных библиотек соединений, отобранных из обширной коллекции, содержащей более 1.9 млн соединений, «Енамина» (www.enamine.net). Исходя из опубликованных данных об ингибиторах IGF1R и о кристаллической структуре киназного домена этого рецептора, отбор осуществляли по двум независимым направлениям виртуального скрининга – мишень- и лиганд-ориентированному. Соединения, содержащие потенциальные токсифорные и реакционноспособные структурные фрагменты, удаляли при помощи фильтрации, основанной на критериях медицинской химии [14]. Такой подход помогает быстро идентифицировать новые фармакологически активные соединения, не прибегая к крупномасштабному скринингу больших наборов, объединенных по принципам случайного химического разнообразия. Основной идеей был поиск соединений, отличных от известных хемотипов ингибиторов IGF1R и выходящих за рамки парадигмы связывания в каталитическом сайте киназы и прямой конкуренции с АТФ. Мы использовали несколько подходов к моделированию *in silico* для создания мини-библиотек, состоящих из нескольких сотен соединений каждая, которые затем экспериментально протестировали в биохимической

кеназной тест-системе. В общей сложности в ходе этой работы проверили около 4000 соединений, включая аналоги активных соединений, найденных при первичном скрининге. Два из упомянутых вычислительных подходов, основанных на тестировании 2935 молекул, привели к открытию описанных ниже нескольких новых хемотипов с привлекательными свойствами и структурной новизной.

Недавно была описана серия аллостерических ингибиторов киназного домена IGF1R [15]. Механизм работы этих соединений основан на связывании с аллостерическим карманом, который не пересекается с каталитическим сайтом и пространственно расположен недалеко от киназной «активационной петли», фосфорилируемой в трех положениях в процессе активации фермента [16, 17]. Активность данных соединений не очень высока, но селективность части из них в отношении ингибирования киназной активности IGF1R была до 10 раз выше по сравнению с InsR. Такие результаты позволили нам предположить, что этот сайт связывания представляет интерес для создания селективных ингибиторов IGF1R. Для создания библиотеки ингибиторов на основании рентгеноструктурных данных (PDB-код 3LWO) мы построили фармакофорную модель (рис. 1) взаимодействия описанной серии соединений с аллостерическим сайтом. В ее состав вошли Н-донор, Н-акцептор, ароматическое/псевдоароматическое кольцо и любая группа, пространственно удаленная от основного молекулярного кластера.

Один из ключевых моментов связывания молекулы в аллостерическом сайте – водородная связь с карбонильной группой Val1063. Для этого в молекуле должен быть фрагмент, идентифицируемый как сильный донор водородной связи. Неоднозначность трактовки этого термина в различных программах химического поиска вынудила нас подобрать такой алгоритм самим.

Перед дальнейшим виртуальным фильтрованием доступной коллекции (~1900000 соединений, www.enamine.net) мы отобрали из нее все сильные доноры водородной связи. Сильными донорами считали соединения следующих типов: все алифатические амины, включая третичные амины, способные стать донорами водородной связи при протонировании, а также другие соединения с неамидными и несulfонамидными NH-группами. Отбор соединений последней группы производили с использованием SMART ($[*1][*7;H1](!\$([*6,*16;X3,X4] = [O]))!\$([*6,*16;X3,X4] = [O]))$), автоматически выбирающего удачные, с нашей точки зрения, фрагменты. В дальнейшем отбросили все соединения, у которых не было ароматического кольца или Н-акцептора. Далее полученную базу соеди-

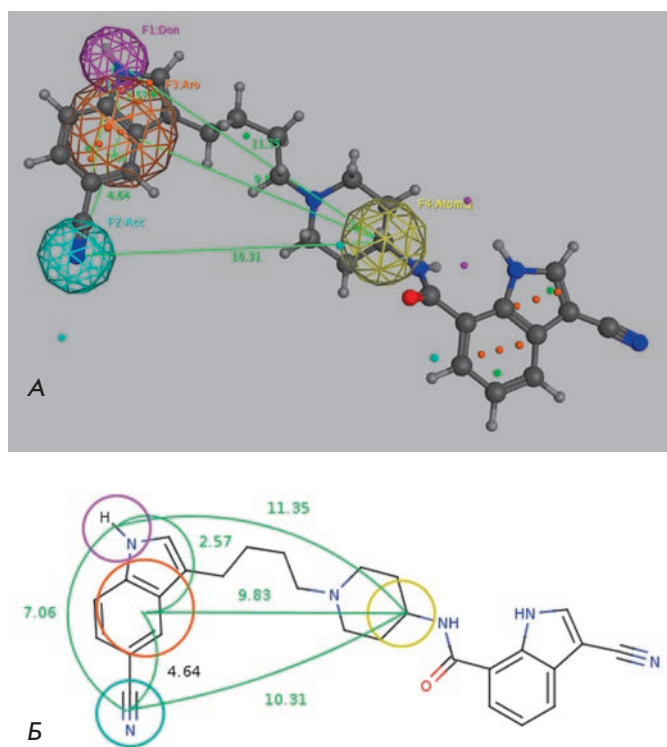


Рис. 1. Фармакофорная модель, использованная при виртуальном скрининге. **А** – Фармакофорная модель ингибитора IGF1R, созданная на основе данных рентгеноструктурного анализа, для 3-циано-N-{1-[4-(5-циано-1H-индол-3-ил)-бутил]пиперидин-4-ил}-1H-индол-7-карбоксамид. Ингибитор IGF1R показан в шаро-стержневом отображении. **Б** – Общая фармакофорная модель с указанными расстояниями между ключами поиска. Пурпурный – донор водородной связи; голубой – акцептор водородной связи; оранжевый – ароматическое кольцо; желтый – любой тяжелый атом; зеленый – расстояния между центрами фармакофорных групп

нений (около 400000) фильтровали на соответствие построенной фармакофорной модели. При этом были доступны все степени свободы для вращаемых связей, а также наложено дополнительное правило «запрещенного объема» на атомы белка. После обработки исходной базы по данным правилам найдено 42031 соединения, которые строго отвечают параметрам модели. Эти соединения поступили на следующий этап обработки – молекулярный докинг.

Докинг проводили с использованием модели гибкого лиганда и фиксированного рецептора, используя алгоритм систематического докинга (SDOCK+), который обладает достаточной способностью воспроизведения конформаций лигандов с минимальным

среднеквадратичным отклонением (RMSD) относительно кристаллографических данных [18]. Максимальное число шагов расчета устанавливали на 300 и 20 лучших полученных комплексов (исходя из внутренних скоринг-функций QXP) сохраняли для анализа. Модель сайта связывания формировалась исходя из рентгеноструктурных данных комплекса 3LWO. При создании модели сайта связывания учитывали аминокислотные остатки в радиусе 1.0 нм вокруг исходного ингибитора, попадающие в этот объем хотя бы частью атомов.

Обработку данных после докинга и анализ результатов осуществляли по принципу максимального следования логике фармакофорной модели, создавая которую мы определили ключевые параметры, влияющие на силу связывания лиганда с сайтом. Применяли следующие основные геометрические фильтры – водородную связь с Val1063, стекинг-взаимодействие с Met1054 и Met1079, а также ряд второстепенных – электростатическое взаимодействие с Lys1033 и/или образование водородных связей с Asp1153 и/или Glu1050, Arg1134 (нумерация по PDB-коду 3LWO). При выборке соединений в полном объеме учитывали основные фильтры, а также один или несколько второстепенных. После автоматического фильтрования проводили визуальную инспекцию для проверки соответствия правил фильтрования выбранной модели. Отобранные 1746 соединений, по механизму формирования выборки обозначенные как группа Т (target – мишень), рекомендовали для высокопроизводительного скрининга. Как пример можно привести взаимодействие производного 1,2-дигидропиридин-2-тиона (соединение Т2) с моделью аллостерического сайта связывания (рис. 2). В этом случае были выполнены все основные требования модели, три дополнительных взаимодействия, а именно, реализуются водородные связи/стекинг с Arg1134, His1133 и Asp1154. Эти условия, по нашему мнению, достаточны для проявления ингибиторной активности по постулированному выше механизму.

Виртуальный скрининг. Лиганд-ориентированная выборка

Выборка потенциальных ингибиторов IGF1R была создана с использованием лиганд-ориентированного подхода и с учетом характеристик ингибиторов IGF1R, описанных группой Левицкого [19]. Так как показано, что ряд исследованных соединений имеют АТР-неконкурентный механизм ингибирования IGF1R и проявляют существенную селективность к IGF1R в сравнении с InsR, на их основе предприняли поиск структурно удаленных аналогов из коллекции веществ «Енамина». Анализ соотноше-

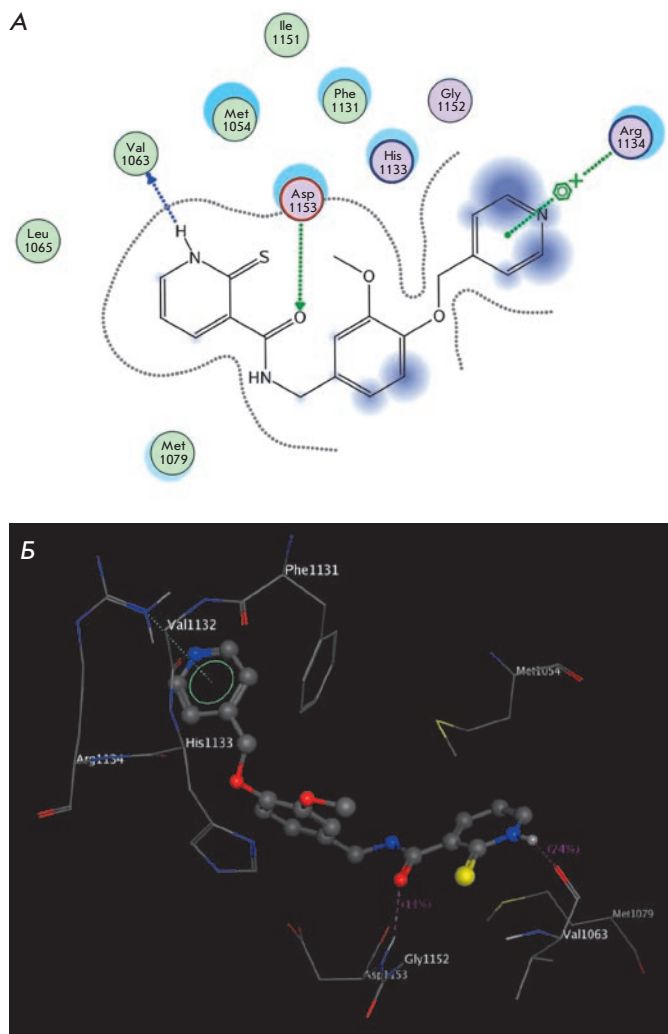


Рис. 2. Ключевое взаимодействие соединения T2 с моделью сайта связывания IGF1R. А – Двумерная диаграмма, показывающая ключевые взаимодействия; Б – комплекс лиганд–мишень, полученный при докинге

ния структура–активность в этих соединениях (некоторые изображены на рис. 3) позволил определить те их структурные особенности, которые могут повышать эффективность ингибирования. В частности, соединения, содержащие бензольные кольца, замещенные во 2-м или 3-м положении и соединенные насыщенными NH-CH₂- или CH₂-N-CH₂-линкерами, проявили себя как эффективные ингибиторы киназной активности, в то время как дальнейшее увеличение длины линкера приводило к снижению эффективности ингибирования. По меньшей мере одна группа, содержащая атом-акцептор водородной связи (N- или O-), должна располагаться в пара- и/или мета-положениях бензольных колец, связанных

между собой линкером. Мощность ингибирования с очевидностью снижается от класса к классу в таком порядке: катехолы > производные салициловой кислоты > бензодиоксолы. Можно предположить, что наличие свободно вращающихся атомов-акцепторов, расположенных в пара- и/или мета-положениях бензольных ядер в молекуле, обеспечивает эффективное связывание с киназой. Более того, дополнительные акцепторные атомы водорода увеличивают эффект ингибирования IGF1R при их размещении как в ароматическом ядре молекулы, так и в составе алифатического заместителя (рис. 3А,Б,В). В то же время ацилирование пара- и/или мета-групп (рис. 3А,Г) не влияло существенно на активность, но повышало селективность ингибирования InsR- и Src-киназ. Полностью замещенные бензодиоксольные вещества без водородных доноров также проявляли ингибиторную активность.

Данные наблюдения были сведены в формулу Маркуша (рис. 3Ж). Предложенная структура должна содержать как минимум два пяти- или шестиатомных ароматических цикла и по крайней мере один из перечисленных ниже заместителей R в положениях 3 и/или 4 ароматической системы. Такими группами (R) могут быть уже описанные O- и N-содержащие заместители, а также фтор- и α-фторалкильные заместители как потенциальные акцепторы водорода. Эти R-группы могут быть включены в циклы. Линкеры длиной от одного до трех атомов, образованные любыми нециклическими связями (одиночными, двойными или тройными), использовали для соединения ароматических циклов. В параметры поиска соединений в базе данных был введен критерий «любой элемент, кроме водорода» для составляющих как циклических ядер, так и линкеров. В результате поиска *in silico* с использованием программного обеспечения Instant JChem из ~1.9 млн соединений коллекции «Енамина» отобрали 1327, соответствующих формуле Маркуша. После применения упомянутых фильтров медицинской химии [14], а также установки предельных значений предсказанной расчетами водной растворимости и липофильности ($\log P < 5$ и $\log S < 5$), из этих 1327 соединений для ВЭС выбрали группу из 607 соединений, обозначенную как выборка L (ligand).

Высокоэффективный скрининг и исследование зависимостей доза–эффект

Скрининг выборок Т-типа (1746 соединений) и L-типа (607 соединений), сформированных согласно описанным выше методикам, проводили с использованием коммерческих тест-систем компании Promega для детекции (ADP-Glo) и киназной реакции для IGF1R. В киназной тест-системе используется

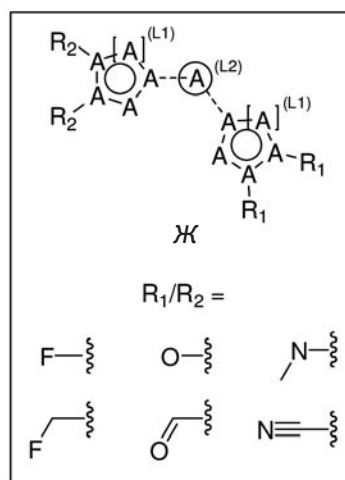
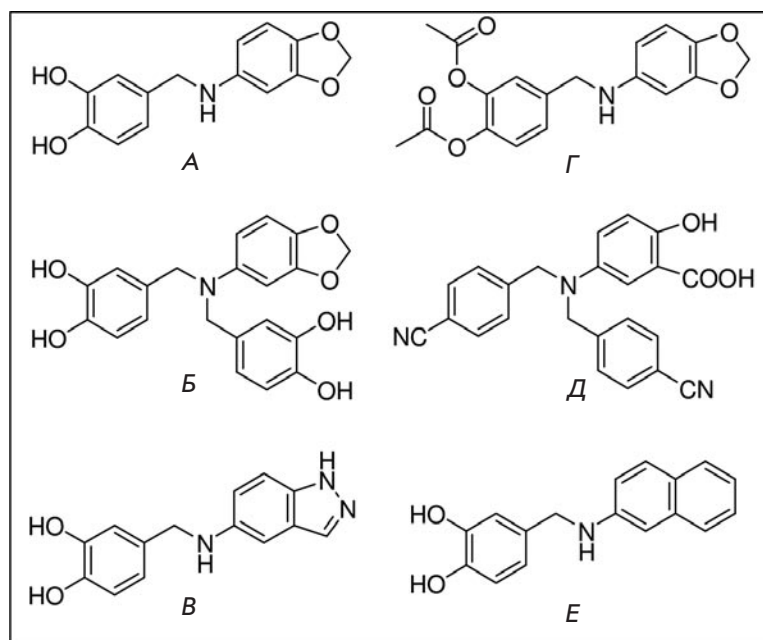


Рис. 3. Ингибиторы IGF1R, на основе которых создана L-выборка (А–Е) и формула Маркуша (Ж), по которой осуществлялся их отбор

рекомбинантный внутриклеточный фрагмент IGF1R, а эффективность киназной реакции оценивается по количеству ADP – универсального продукта киназной реакции – посредством ферментативного превращения ADP в АТФ, с последующим определением активности АТФ-зависимой люциферазы [20]. Перед осуществлением ВЭС тест-систему валидировали с использованием коммерчески доступных ингибиторов IGF1R – производного диарилмочевины PQ401 [21] и тирфостина AG538 [22], а также пан-киназного ингибитора стауроспорина. Кривые зависимости доза–эффект, построенные для данных ингибиторов, соответствовали опубликованным данным [21, 22]. Кроме того, воспроизводимость ВЭС проверяли дополнительно – от дня ко дню, а также от планшета к планшету согласно требованиям к проведению ВЭС.

Все соединения, показавшие статистически значимую ингибиторную активность в первичном ВЭС (первичные хиты), проверяли как минимум еще 1 раз. Структурные аналоги обнаруженных хитов были отобраны из коллекции «Енамина» методом хемоинформационного поиска и также исследованы в ВЭС в процессе расширения хитов (рис. 4). Расширение хитов осуществляли путем отбора ближайших структурных аналогов наиболее активных соединений первичного ВЭС с варьированием всех возможных заместителей в структуре молекулы (субструктурный поиск). Отдельным условием соединений из Т-выборки было сохранение ключевого фармакофора, отображенного на рис. 1.

В результате первичного скрининга выборки Т-типа в тест-системе IGF1R-ADP-Glo обнаружили три хита; четвертый хит из этой группы (Т4) выявили после процедуры расширения. Скрининг выборки L-типа также позволил идентифицировать три активных соединения – L1, L2, L3; четвертый хит L4 нашли после расширения. Эти ингибиторы выбрали для дальнейшего изучения. Критерии отбора включали: оценку мощности ингибирования, воспроизводимость результатов ингибирования, а также химические особенности молекул, в частности новизну структуры, возможность модификации молекулы и отсутствие нежелательных функциональных групп, которые могут помешать дальнейшему развитию химической серии.

Селективность ингибиторов

Селективность ингибирования восьми идентифицированных в результате ВЭС хитов проверили в тест-системах для киназ InsR, Met, Syk и Btk. В то время как InsR является ближайшим структурным аналогом IGF1R, остальные три фермента – это эволюционно более отдаленные рецепторная (Met) или цитоплазматические (Syk, Btk) тирозинкиназы. С целью сравнения IGF1R и InsR построили кривые зависимости доза–эффект для восьми соединений и определили значения IC_{50} (табл. 1). Ингибирование остальных киназ оценивали при одной концентрации изучаемых соединений. Кинетику ингибирования всех киназ изучали в условиях, близких к условиям проведения тестов IGF1R и с использованием единой системы де-



Рис. 4. Схема высокоэффективного скрининга

текции ADP-Glo, что обеспечивает оптимальную возможность сравнения результатов между собой. Эта небольшая киназная панель не может предсказать профиль ингибирования более чем 500 протеинкиназ человека тестируемыми соединениями, однако позволяет провести предварительную оценку селективности к мишени внутри группы тирозинкиназ, эволюционно наиболее родственной IGF1R. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что эффективность ингибирования IGF1R и InsR соединениями L1, L3, L4 очень близка между собой, но L2, T2 и T4 ингибируют IGF1R в 1.5–4 раза сильнее, чем InsR. Интересно отметить, что в наших экспериментах T1 и T3 ингибировали активность киназы InsR в 5–10 раз сильнее, чем IGF1R. Подобные параметры селективности сходны или лучше, чем практически у всех известных низкомолекулярных ингибиторов IGF1R при демонстрации в корректных биохимических тест-системах [23], что очевидно отражает исключительно высокую степень структурной идентичности каталитических сайтов и их близкого окружения у этих рецепторов. Эксперименты по ингибированию других тирозинкиназ (табл. 2) показали, что соединения L1 и T3 в концентрации 40 мкМ практически не подавляют активность киназ Met, Btk и Syk, в то время как остальные исследуемые соединения могут оказывать слабый ингибиторный эффект (оценочные $IC_{50} > 50$ мкМ).

Таблица 1. Ингибирование IGF1R и InsR (IC_{50}) хитами из L- и T-выборок

Соединение	Структура	IC_{50} , мкМ	
		IGF1R	InsR
L1		18	22
L2		25	100
L3		26	29
L4		25	30
T1		~100	20
T2		18	30
T3		~100	10
T4		7	10

Таблица 2. Ингибирование Met, Syc и Btk хитами из L- и T-выборок

Соединение*	Активность Met, %	±SD	Активность Syc, %	±SD	Активность Btk, %	±SD
L1	102	3	109	16	98	10
L2	63	2	48	5	106	6
L3	77	4	88	4	106	8
L4	60	2	53	9	113	11
T1	78	2	84	10	92	11
T2	62	4	72	13	83	8
T3	98	3	115	12	81	8
T4	75	3	115	19	82	5

*Концентрация соединений 40 мкМ.

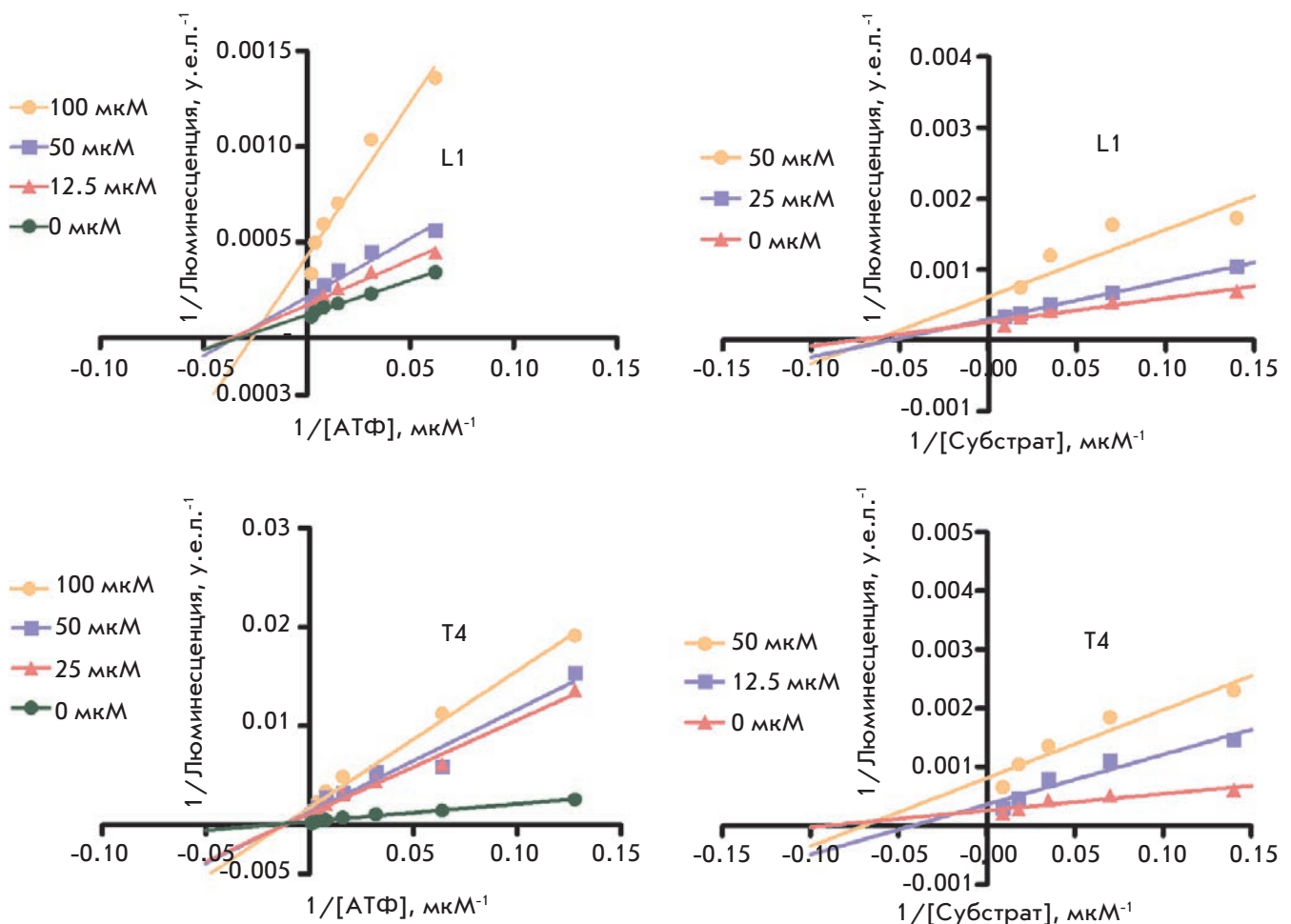


Рис. 5. Графики Лайнуивера–Берка для соединений L1 и T4

Изучение кинетики ферментативной реакции в присутствии ингибиторов

Из каждой группы произвольно отобрали по одному соединению (L1 и T4) для более подробного изучения механизма их действия (рис. 5). Согласно графикам Лайнуивера–Берка, оба ингибитора не конкурируют ни с АТФ, ни с субстратом за связывание с IGF1R. Так как процесс отбора потенциальных ингибиторов для первичного ВЭС предполагал, что соединения из L- и T-групп будут аллостерическими эффекторами, этот результат подтверждает правильность рабочих моделей. Сайт связывания соединений T-типа соотносится, скорее всего, с аллостерическим сайтом связывания индолалкиламинов, положенным в основу разработанной фармакофорной модели [15]. Этот сайт пространственно отделен от каталитического сайта фермента. Информация о сайте связывания соединений из L-выборки с киназой отсутствует. Некоторые прототипы L-группы, положенные в основу критериев формирования скрининговых выборок для данного исследования, также имеют АТФ-неконкурентный механизм ингибирования киназы [19]. Данные же о конкуренции этих соединений с субстратом на данный момент не найдены. Поскольку аллостерические сайты связывания обычно структурно менее консервативны, чем активные сайты киназы, аллостерический механизм ингибирования, обнаруженный у изученных нами соединений, расширяет возможности дальнейшей химической оптимизации селективности найденных ингибиторов.

Таким образом, описанная нами группа ингибиторов IGF1R соответствует всем стандартным требованиям, предъявляемым к перспективным фармакологически активным соединениям, обнаруженным в ходе поискового скрининга высокой производительности (хитам), – воспроизводимость и дозозависимость фармакологического ответа, приемлемые параметры ингибирования молекулярной мишени ($IC_{50} = 10–25$ мкМ) и селективность по отношению к родственным мишеням, отсутствие нежелательных с точки зрения медицинской химии структурных элементов, литературная новизна соединений и доступность синтетических путей для их модификаций. Кроме того, соединения проявляют свойства аллостерических ингибиторов, что было одной из целей скрининга. Обнаруженные нами в результате рационального, высокоэффективного скрининга две серии ингибиторов могут служить перспективными отправными точками для разработки новых терапевтических блокаторов активности IGF1R. ●

Авторы благодарят компанию Promega Corporation (Мэдисон, Висконсин, США) за предоставление тест-систем и реагентов для высокоэффективного поискового скрининга ингибиторов IGF1R, а также изучения их селективности и механизмов ингибирования. Авторы благодарят Джона Уотсона и Татьяну Рудую (Promega) за помощь и поддержку при проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pollak M.N., Schernhammer E.S., Hankinson S.E. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 505–518.
- Pollak M. // Nat. Rev. Cancer. 2008. V. 8. P. 915–928.
- Khandwala H.M., McCutcheon I.E., Flybjerg A., Friend K.E. // Endocrine Rev. 2000. V. 21. № 3. P. 215–244.
- López-Calderero I., Sánchez Chávez E., García-Carbonero R. // Clin. Transl. Oncol. 2010. V. 12. P. 326–338.
- Buck E., Mulvihill M. // Expert. Opin. Invest. Drugs. 2011. V. 20. № 4. P. 605–621.
- Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. // Endocrine Rev. 2009. V. 30. № 6. P. 586–623.
- Pollak M. // Nat. Rev. Cancer. 2012. V. 12. P. 159–169.
- Buck E., Gokhale P.C., Koujak S., Brown E., Eyzaguirre A., Tao N., Rosenfeld-Franklin M., Lerner L., Chiu M.I., Wild R., et al. // Mol. Cancer Ther. 2010. V. 9. № 10. P. 2652–2664.
- Ludwig J.A., Lamhamedi-Cherradi S.-E., Lee H.-Y., Naing A., Benjamin R. // Cancers. 2011. V. 3. № 3. P. 3029–3054.
- Yee D. // JNCI J. Natl. Cancer. Inst. 2012. V. 104. № 13. P. 975–981.
- McMartin C., Bohacek R.J. // Comput.-Aided Mol. Des. 1997. V. 11. № 4. P. 333–344.
- Zhang J., Chung T.D., Oldenburg K.R. // J. Biomol. Screen. 1999. V. 4. P. 67–73.
- Lineweaver H., Burk B. // J. Am. Chem. Soc. 1934. V. 56. № 3. P. 658–666.
- Chuprina A., Lukin O., Demoiseaux R., Buzko A., Shivanyuk A.J. // Chem. Inf. Model. 2010. V. 50. P. 470–479.
- Heinrich T., Grodler U., Bottcher H., Blaukat A., Shutes A. // ACS Med. Chem. Lett. 2010. V. 1. P. 199–203.
- Munshi S., Kornienko M., Hall D.L., Reid J.C., Waxman L., Stirdivant S.M., Darke P.L., Kuo L.C. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 38797–38802.
- Li W., Favelyukis S., Yang J., Zeng Y., Yu J., Gangjee A., Miller W.T. // Biochem. Pharmacol. 2004. V. 68. P. 145–154.
- Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S., et al. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. № 20. P. 5912–5931.
- Steiner L., Blum G., Friedmann Y., Levitzki A. // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 562. № 1–2. P. 1–11.
- Li H., Totoritis R.D., Lor L.A., Schwartz B., Caprioli P., Jurewicz A.J., Zhang G. // Assay Drug Dev. Technol. 2009. V. 7. № 6. P. 598–605.
- Gable K.L., Maddux B.A., Penaranda C., Zavodovskaya M., Campbell M.J., Lobo M., Robinson L., Schow S., Kerner J.A., Goldfine I.D., et al. // Mol. Cancer Ther. 2006. V. 5. № 4. P. 1079–1086.
- Blum G., Gazit A., Levitzki A. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 51. P. 15705–15712.
- Chene P., Hau J.-C., Blechschmidt A., Fontana P., Bohn J., Zimmermann C., De Pover A., Erdmann D. // Open Enz. Inhib. J. 2010. V. 3. № 1. P. 27–37.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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. 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 возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращением (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



БИОИНДУСТРИЯ

16-18 ОКТЯБРЯ 2013

3-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНФЕРЕНЦИЯ

ИННОВАЦИОННЫХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ВОСПРОИЗВОДСТВА,
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И ЦЕЛЕСООБРАЗНОГО РАЗВИТИЯ
ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ И СРЕДЫ ИХ ОБИТАНИЯ

Санкт-Петербург, ВК «Ленэкспо»
+7 812 240 40 40 доб. 229, 279, 127

Организатор  EXPOFORUM

www.bioindustry.ru

www.expoforum.ru

ДЛЯ СТУДЕНТОВ, МОЛОДЫХ УЧЕННЫХ И ИННОВАТОРОВ

INNOSTAR

КОНКУРС ПРОЕКТОВ

ПРИШЛИ ЗАЯВКУ
НА СЪЕМКУ РОЛИКА



ЛУЧШИЕ ПОЛУЧАТ
ПРЕМИИ

КЛУБ INNOSTAR

СЕМИНАРЫ
МАСТЕР-КЛАССЫ
ТРЕНИНГИ



СТАНЬ ЗВЕЗДОЙ ИННОВАЦИЙ!



ПРИ ПОДДЕРЖКЕ
ДЕПАРТАМЕНТА НАУКИ,
ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОЛИТИКИ
И ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬСТВА
ГОРОДА МОСКВЫ



ОРГАНИЗАТОР

WWW.INNOSTAR.RU



ФЕСТИВАЛЬ ИДЕЙ И ЗНАНИЙ ИСКУССТВО НАУКИ



ФЕВРАЛЬ-ИЮЛЬ 2013

ПРИМИ УЧАСТИЕ!

КОНКУРС ФОТО И ВИДЕО
КОНКУРС СТАТЕЙ И ПРОЕКТОВ
ЛЕКТОРИЙ И КИНОКЛУБ IQ-ФИЛЬМ
ЭКСКУРСИИ И ФОТОВЫСТАВКА

ОРГАНИЗАТОР: 	СПОНСОР НОМИНАЦИИ: dyson	ГЛАВНЫЙ ПАРТНЕР В ОБЛ. ПЕЧАТИ: foto video	ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР: NewScientist	ПЛОЩАДКИ: SCRF Digital Camera		МММ
ПРИ ПОДДЕРЖКЕ: 	ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ИНФОРМ. ПАРТНЕР: gazeta.ru	ГЛАВНЫЙ РАДИЙНЫЙ ПАРТНЕР: РАДИО КУЛЬТУРА	365	РУССКИЙ РЕПОРТЕР		
	ГЛАВНЫЙ ТВ ПАРТНЕР: Москва 24	ГЛАВНЫЙ ИНТЕРНЕТ-ПАРТНЕР: RAVOTA.RU	НАУКА И ЖИЗНЬ	NANO TV	24T E XHD	FAQ creative studio

WWW.ARTSCIENCEFEST.RU

