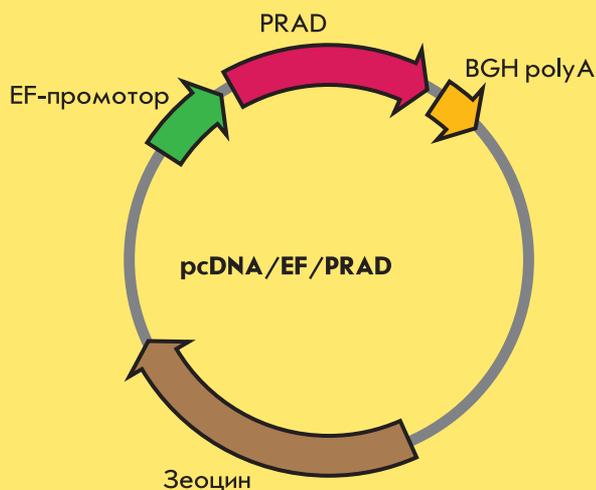
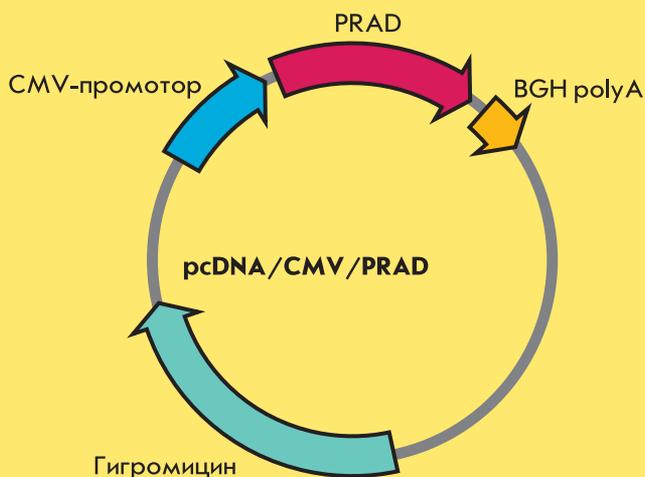
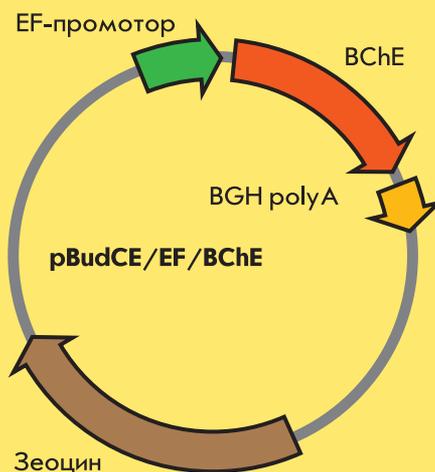
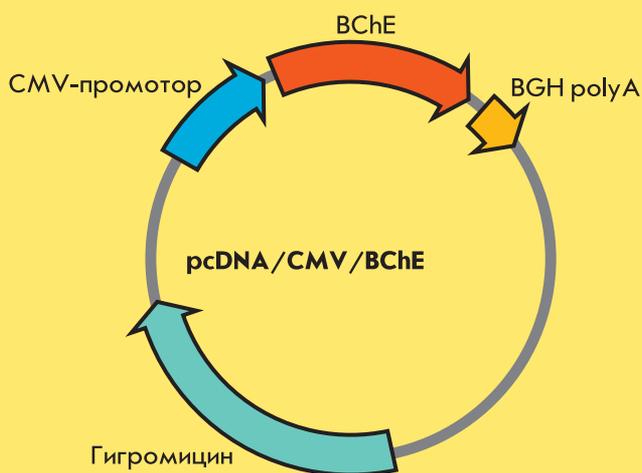


# Acta Naturae

## Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы



**ИМПУЛЬСНЫЙ ДВОЙНОЙ  
ЭЛЕКТРОН-ЭЛЕКТРОННЫЙ РЕЗОНАНС  
В СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ  
СПИН-МЕЧЕНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**  
СТР. 9

**РЕКОМБИНАНТНАЯ  
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА  
ЧЕЛОВЕКА КАК  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНТИДОТ**  
СТР. 76

# Письмо редакторов

**У**важаемые читатели!  
Наступил 2013 год, и настало время выхода 16 номера *Acta Naturae*. Желаем всем вам, нам и, главное, нашему журналу дальнейших успехов и беспечального житья в 2013!

О текущем номере. Крупнейшим событием для биологов нашей страны и всего мира в 2013 году будет 38-й Конгресс Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО), который пройдет летом в Санкт-Петербурге. Наш журнал тесно связан с этим мероприятием, и мы решили посвятить рубрику «Форум» информации об этом знаменательном событии и пригласить всех наших читателей принять в нем участие.

Научная часть номера содержит три обзора, как всегда, названия которых еще раз свидетельствуют о широте тематики нашего журнала.

Действительно, первый обзор посвящен физикохимии нуклеиновых кислот (О.С. Федорова и Ю.Д. Цветков), второй – биотехнологии (О.Г. Максименко, А.В. Дейкин, Ю.М. Ходарович и П.Г. Георгиев), а третий – популяционной генетике (В.И. и Т.Т. Глазко). Надеемся, что представленные материалы будут полезны ученым, работающим в смежных областях наук о живом.

Комментируя научные сообщения, хочется отметить возрастающий поток публикаций, выполненных вне России или в кооперации российских и иностранных ученых. Думаем, что это следствие нашего «проникновения» в PubMed и другие базы данных. Со своей стороны мы будем и впредь всячески приветствовать публикации из-за рубежа!

До встречи в следующем номере! ●

*Редакционная коллегия*

# Наука и технологии России – STRF.ru



- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются, что публикации о результатах исследований помогут им выделиться на фоне коллег и конкурентов...  
...при этом
- 17% учёных никогда не общались с журналистами\*

Откройте миру свои открытия

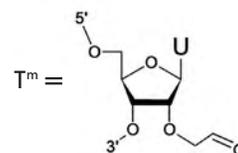
## Структурно-функциональный анализ 2,1,3-бензоксадиазолов и их N-оксидов в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1

С. П. Королев, О. В. Кондрашина, Д. С. Дружиловский, А. М. Старосотников, М. Д. Дутов, М. А. Бастраков, И. Л. Далингер, Д. А. Филимонов, С. А. Шевелев, В. В. Поройков, Ю. Ю. Агапкина, М. Б. Готтих

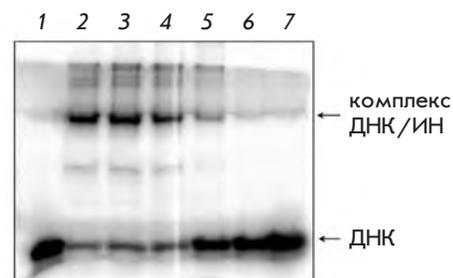
Интеграза вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) считается одной из самых привлекательных мишеней для разработки ингибиторов этого вируса. В настоящей работе изучена способность ряда отобранных с использованием компьютерной программы PASS 2,1,3-бензоксадиазолов (бензофуразанов) и их N-оксидов (бензофуруксанов) подавлять каталитическую активность интегразы ВИЧ-1. Установлено, что ингибирующая способность этих соединений сильно зависит от наличия нитрогруппы. Показано, что нитробензофуразаны и нитробензофуруксаны препятствуют связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента. Эти ингибиторы оказались активными и в отношении мутантов интегразы, устойчивых к действию ралтегравира – единственного разрешенного к клиническому применению ингибитора интегразы.

А

USB 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3'  
USA<sup>m</sup> 3'-CACACCTTTTAGAGATCGT<sup>m</sup>CA-5'



Б



Влияние соединения **6** на эффективность ковалентного присоединения аналога ДНК-субстрата, содержащего альдегидную группу, к интегразе

## Источники противоречий в оценке популяционно-генетических последствий черновыльской аварии

В. И. Глазко, Т. Т. Глазко

В обзоре рассматриваются популяционно-генетические последствия обитания разных видов млекопитающих в условиях высокого уровня ионизирующего облучения в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Представлены данные, свидетельствующие о том, что такие условия способствуют предпочтительному воспроизводству гетерозигот в полилокусных спектрах молекулярно-генетических маркеров, а также животных с относительно повышенной стабильностью хромосомного аппарата. Обсуждается перспективность использования репродуктивного «успеха» носителей этих характеристик в качестве интегрального показателя селективного действия факторов экологического стресса.

**Таблица 1.** Частота встречаемости микроядер в 1000 эритроцитов (ЭМЯ) периферической крови мышей линий CC57W/Mv разного возраста из черновыльской и киевской популяций в разные сезоны

Сезон	ЭМЯ, контроль, ‰		ЭМЯ, Чернобыль, ‰	
	2.5–3.5 мес.	14–16 мес.	2.5–3.5 мес.	14–16 мес.
Зима 1993	2.5 ± 0.7	2.7 ± 0.9	10.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0
Лето 1994	3.0 ± 0.8	3.2 ± 0.7	6.5 ± 1.0	3.8 ± 0.3

# Acta Naturae

ТОМ 5, № 1 (16), ЯНВАРЬ—МАРТ 2013

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

*Ответственный секретарь:* В.Д. Кнорре  
*Издатель:* 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. Швьядас (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  
*Корректура:* Р.С. Шаймарданова  
*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

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

О. С. Федорова, Ю. Д. Цветков  
Импульсный двойной  
электрон-электронный резонанс  
в структурных исследованиях  
спин-меченых нуклеиновых кислот..... 9

О. Г. Максименко, А. В. Дейкин,  
Ю. М. Ходарович, П. Г. Георгиев  
Использование трансгенных животных  
в биотехнологии: перспективы  
и проблемы..... 33

СОДЕРЖАНИЕ

В. И. Глазко, Т. Т. Глазко

**Источники противоречий  
в оценке популяционно-генетических  
последствий чернобыльской аварии. . . . 48**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

С. П. Королев, О. В. Кондрашина,  
Д. С. Дружиловский, А. М. Старосотников,  
М. Д. Дутов, М. А. Бастраков, И. Л. Далингер,  
Д. А. Филимонов, С. А. Шевелев, В. В. Поройков,  
Ю. Ю. Агапкина, М. Б. Готтих

**Структурно-функциональный  
анализ 2,1,3-бензоксадиазолов  
и их N-оксидов в качестве  
ингибиторов интегразы ВИЧ-1 . . . . . 65**

Д. Г. Илюшин, О. М. Эртле, Т. В. Бобик,  
О. Г. Шамборант, Е. А. Сурина, В. Д. Кнорре,  
Р. Masson, И. В. Смирнов, А. Г. Габиров,  
Н. А. Пономаренко

**Рекомбинантная бутирилхолинэстераза  
человека как биологический  
антидот нового поколения:  
разработка эукариотической  
системы экспрессии. . . . . 76**

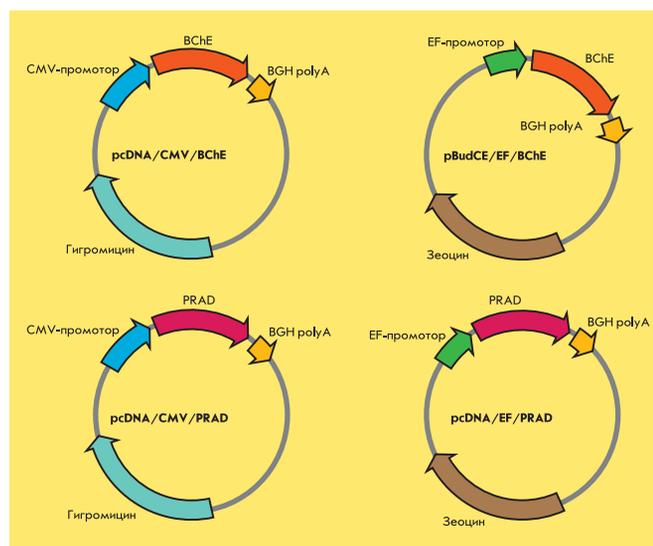
Z. Shevchuk, M. Y. Yurchenko, S. D. Darekar,  
I. Holodnuka-Kholodnyuk, V. I. Kashuba,  
E. V. Kashuba

**Overexpression of MRPS18-2 in Cancer  
Cell Lines Results in Appearance  
of Multinucleated Cells . . . . . 88**

Н. В. Пунина, В. С. Зотов, А. Л. Пархоменко,  
Т. Ю. Пархоменко, А. Ф. Топунов

**Изучение генетического разнообразия  
*Bacillus thuringiensis*, выделенных  
в различных эколого-географических  
зонах Украины, при помощи анализа  
генов 16S рРНК, *gyrB* и методов  
АР-ПЦР и saAFLP. . . . . 93**

**Правила для авторов . . . . . 104**



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**

Схематическое изображение экспрессионных кон-  
струкций. (См. статью Илюшина и др.)



Дорогие читатели журнала *Acta Naturae*!

Со страниц этого номера нам хотелось бы поделиться с вами информацией о проведении в России 38-го Конгресса Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО). Наш журнал является одним из спонсоров Конгресса, а соучредитель журнала компания «Парк-медиа» одним из основных соорганизаторов. Руководство нашего издания – вице-президент РАН А.И. Григорьев (председатель редакционного совета журнала) и редакторы члены-корреспонденты РАН С.Н. Кочетков и А.Г. Габибов, ответственный секретарь редакции кандидат химических наук В.Д. Кнорре работают непосредственно над реализацией научной программы и основных мероприятий Конгресса.

**Р**ешение о проведении Конгресса в 2013 году в Петербурге принято на 36-й ассамблее ФЕБО в Турине. Это событие было с энтузиазмом воспринято научной общественностью нашей страны и получило большой международный резонанс. В относительно короткие сроки удалось создать основу научной программы, в подготовке которой неоценимый вклад внес международный консультативный совет Конгресса под руководством лауреата Нобелевской премии проф. Ричарда Робертса (США) и секретаря совета проф. Майкла Блэкберна (Великобритания). Создалась уникальная ситуация – практически все пленарные докладчики Конгресса лауреаты Нобелевской премии, крупнейшие ученые нашего времени Аарон Чехановер, Жюль Хоффман, Роберт Хубер, Роджер Корнберг, Жан-Мари Лен, Ричард Робертс, Джек Шостак, Джон Уолкер, Курт Вютрих, Ада Йонат, Сидней Альтман, Сусуми Тонегава.

Конгрессы ФЕБО входят в пятерку самых престижных мировых форумов в области наук о жизни. Подобный конгресс проводился в нашей стране лишь однажды, в 1984 году под руководством вице-президента АН СССР Ю.А. Овчинникова. Президент нынешнего 38-го Конгресса – академик В.П. Скулачев, научная сторона данного мероприятия доверена Национальному комитету биохимиков Российской академии наук. Общие организационные мероприятия по Конгрессу проходят в рамках распоряжения Правительства РФ № 1965-р от 22 октября 2012 года и обсуждаются на заседаниях Оргкомитета под председательством министра образования и науки РФ Дмитрия Ливанова.

Тематика Конгресса – «Биологические механизмы». Оргкомитет Конгресса прилагает все усилия,

чтобы программа докладов отражала всю широту современных подходов, относящихся к данной тематике. Программа Конгресса будет состоять из 37 симпозиумов. В настоящее время их список находится на заключительной стадии формирования, он включает такие разделы, как иммунология, РНК, биохимия углеводов, биология стволовых клеток, механизмы протеолиза, бактериология, биоинформатика, методы биохимических исследований и многие другие. Ожидается, что в Конгрессе примут участие большое число докладчиков из стран Европы, США, Японии и других государств.

В тематику Конгресса включен ряд именных симпозиумов, посвященных, например, памяти крупнейшего ученого современности, бывшего президента Французской Академии наук, иностранного члена РАН Марианны Грюнберг Манаго, а также симпозиум памяти крупнейшего отечественного биохимика академика Александра Евсеевича Браунштейна. Специальная лекция Нобелевского лауреата Джона Уолкера будет посвящена памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова. Симпозиальные докладчики приглашаются Оргкомитетом, при этом планируется провести конкурс заявок на стендовые доклады, победители которого будут приглашены выступить с краткими устными сообщениями на соответствующих симпозиумах.

Будет также проведен ряд заседаний, традиционных для конгрессов ФЕБО, посвященных, в частности, проблемам биохимического образования и роли женщин в науке. Семинар «Наука и общество» будет посвящен онкологическим заболеваниям. Перед открытием Конгресса состоится Форум молодых ученых, а в течение всей работы будет проходить выставка научного и биомедицинского оборудования.

Конгресс пройдет с 6 по 11 июля 2013 года в Санкт-Петербурге в Выставочном центре «Ленэкспо», расположенном на Васильевском острове. В непосредственной близости расположен ряд гостиниц, с которыми заключены договорные отношения по расселению делегатов Конгресса на льготных условиях.

Санкт-Петербург – один из красивейших городов Европы, славный своими богатыми культурными и научными традициями. В рамках культурной программы Конгресса его участники смогут посетить Эрмитаж и другие достопримечательности Санкт-Петербурга и его окрестностей, посетить спектакли классического балета.

Мы надеемся, что вы разделяете наш энтузиазм по поводу предстоящего Конгресса, и приглашаем всех представителей научного сообщества принять участие в этом знаменательном форуме. Дополнительную информацию можно найти по ссылкам на нашем сайте [www.febs-2013.org](http://www.febs-2013.org).

В заключение позвольте представить вашему вниманию программу пленарных докладов Конгресса:

**6 июля, 17.00–18.00**

Ж. Хоффман (Jules Hoffmann), Национальный центр научных исследований Франции, Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург, Франция  
«Эволюционные перспективы врожденного иммунитета»

**7 июля, 11.00–12.00**

А. Чехановер (Aaron Ciechanover), Центр исследований биологии рака и сосудистой биологии, факультет им. Раппапорта, Институт исследований в области медицины, Технион (Израильский политехнический институт), Хайфа, Израиль  
«Конец полиубиквитиновой цепочки как индикатор протеасомного сигнала»

**7 июля, 12.00–13.00**

Лекция памяти Юрия Овчинникова

Д. Уолкер (John E. Walker), Медицинский научно-исследовательский совет, отдел изучения биологии митохондрий, Кембридж, Великобритания

**7 июля, 14.30–15.30**

Лекция им. Теодора Бюхера

К. Вютрих (Kurt Wüthrich), Исследовательский институт Скрипса, Ла-Хойя, Калифорния, США  
«Структурная геномика растворимых форм мембранных белков»

**7 июля, 15.30–16.30**

А. Йонат (Ada E. Yonath), Центр биомолекулярных структур им. Х. и М. Киммельман, факультет структурной биологии, Научно-исследовательский институт им. Вейцмана, Реховот, Израиль  
«Современное действие древнейшего механизма образования химических связей»

**8 июля, 11.00–12.00**

Лекция Международного союза биохимии и молекулярной биологии

Д. Шостак (Jack W. Szostak), Медицинский институт Говарда Хьюза; Гарвардская медицинская школа; Массачусетский госпиталь общего профиля, США  
«Происхождение клеточной формы жизни и возникновение дарвиновской теории эволюции»

**8 июля, 12.00–13.00**

Специальная лекция о роли науки в обществе

Г. Шац (Gottfried Schatz), Биоцентр, Университет Базеля, Швейцария

«Цена успеха в науке – что Европа должна сделать для своих молодых ученых»

**8 июля, 14.30–15.30**

Лекция лауреата премии журнала FEBS Journal

**8 июля, 15.30–16.30**

Лекция лидера молодых ученых журнала FEBS Letters

**9 июля, 11.00–12.00**

К. Уолш (Chris Walsh), факультет биологической химии и молекулярной фармакологии, Гарвардская медицинская школа, Бостон, Массачусетс, США

«Химическая логика и ферментативные механизмы сборки веществ в природе»

**9 июля, 12.00–13.00**

Сусуми Тонегава (Susumu Tonegawa), Центр генетики нейронных цепей RIKEN-MIT, Департамент биологии, США

«Энграммы подлинных и ложных воспоминаний»

**9 июля, 13.30–14.30**

Лекция им. Пракаш Датта

Р.Д. Корнберг (Roger D. Kornberg), Медицинская школа Стэнфордского университета, Отделение структурной биологии, Стэнфорд, США

«Молекулярные основы транскрипции у эукариот»

**9 июля, 14.30–15.30**

Пленарная лекция лауреата премии «Женщина в науке»

**10 июля, 11.00–12.00**

Лекция им. Ханса Кребса

Р. Робертс (Richard Roberts), Нью-Инглендбиолабс, Ипсвич, Массачусетс, США

«Бактериальные метиломы»

**10 июля, 12.00–13.00**

П. Георгиев, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

«Хроматиновые инсуляторы и взаимодействия между далеко удаленными элементами»

**10 июля, 14.30–15.30**

Р. Хубер (Robert Huber), Институт биохимии Макса Планка, группа структурных исследований, Мартинсрид, Германия; Мюнхенский технический университет, химический факультет, Гархинг, Германия; Университет Дуйсбург-Эссен, Центр медицинской биотехнологии, Эссен, Германия; Кардиффский университет, Школа биологических наук, Кардифф, Великобритания

«Протеазы и их роль в состоянии здоровья человека и развитии заболеваний»

**10 июля, 15.30–16.30**

Сидней Альтман (Sidney Altman), Департамент клеточной и молекулярной биологии, Университет Йель, Нью-Хейвен, Коннектикут, США

«Антибиотики – настоящее и будущее»

**11 июля, 12.30–13.30**

Лекция Европейской организации молекулярной биологии (ЕМВО)

Ж.-М. Лен (Jean-Marie Lehn), Страсбургский университет, Франция

«Перспективы в химии: от супрамолекулярной к адаптационной химии»

УДК 541.67+577.323

# Импульсный двойной электрон-электронный резонанс в структурных исследованиях спин-меченых нуклеиновых кислот

О. С. Федорова<sup>1\*</sup>, Ю. Д. Цветков<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8<sup>2</sup>Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3

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

Поступила в редакцию 06.08.2012

**РЕФЕРАТ** Обзор посвящен применению метода двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR) для изучения структур спин-меченых ДНК и РНК, в том числе имеющих сложное пространственное строение: тетрамеров, аптамеров, рибопереключателей, трех- и четырехспиральных сочленений. Описаны результаты использования метода для изучения влияния поврежденных нуклеотидов на структуру ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR), спиновые метки, ДНК, РНК, олигонуклеотиды.

## ВВЕДЕНИЕ. ОСНОВЫ ТЕОРИИ МЕТОДА

Метод двойного электрон-электронного резонанса, PELDOR, или DEER (сокращение от Pulsed Electron Double Resonance или от Double Electron Electron Resonance, в дальнейшем используется первое сокращение), предложенный в Институте химической кинетики и горения СО РАН в 1981 году [1], в настоящее время является наиболее популярным ЭПР-методом, широко используемым в структурных исследованиях систем, содержащих парамагнитные центры.

Обзорные статьи, в которых излагается теория метода и приводятся примеры его приложений для структурных исследований, публикуются практически ежегодно. Отметим лишь работы последних пяти лет [2–8]. Несомненно, что благодаря разработке эффективных методов направленного введения спиновых меток наибольшие успехи достигнуты в исследовании биомакромолекул методом PELDOR. Многие из этих работ посвящены изучению ДНК и РНК в конкретных биохимических системах. Однако в обзорах [2–8] они рассматриваются лишь фрагментарно, только наряду с другими примерами приложений PELDOR. Цель данного обзора – систематически изложить результаты приложений PELDOR для структурных исследований важного класса биомакромолекул – ДНК и РНК. В обзор вошли работы, выполненные преимущественно в период с 2003 по первую половину 2012 года.

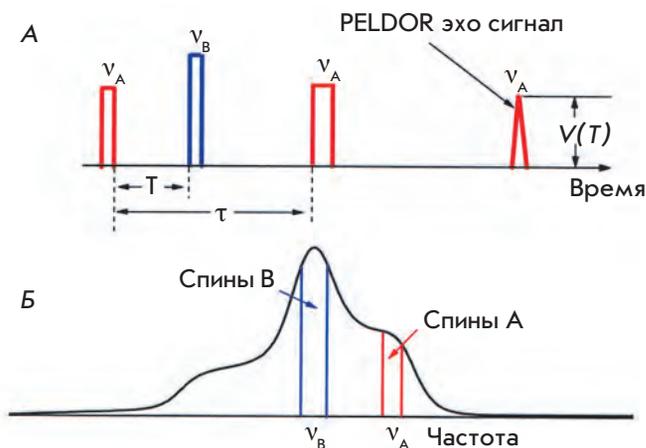
Как правило, для исследований методом PELDOR в молекулы вводят две спиновые метки. Метками обычно служат нитроксильные радикалы. Дипольное и обменное магнитные взаимодействия между метками содержат информацию о расстояниях между метками, их взаимной ориентации, об образовании из них агрегатов и комплексов, о пространственном распределении спиновых меток в исследуемой системе. Важнейшей уникальной особенностью метода является возможность его приложений для хаотически ориентированных систем.

Мы приведем лишь наиболее существенные для анализа результатов PELDOR данные, относящиеся к теории метода. Детальное изложение теории метода можно найти в обзорах [2, 4, 9], а описание методических вопросов и спектрометров PELDOR – в [10].

Магнитное диполь-дипольное взаимодействие спиновых меток А и В определяется дипольной частотой [4, 9, 11]:

$$\omega_{dd} = 2\pi\nu_{dd} = \frac{D}{r^3}(1 - 3\cos^2\theta) + J. \quad (1)$$

Здесь  $D = 327 \text{ рад нм}^3/\text{мс}$  – константа диполь-дипольного взаимодействия,  $r$  – расстояние между спинами,  $\theta$  – угол между направлением внешнего магнитного поля и вектором, соединяющим спины,  $J$  – обменный интеграл. Для определения дипольной частоты, а значит и расстояния между спинами,



**Рис. 1.** А – Импульсная последовательность 3pPELDOR. Под действием на спиновую систему двух импульсов на частоте  $\nu_A$  возникает сигнал спинового эха. Эффект PELDOR регистрируется как спад сигнала эха  $V(T)$  при действии на спиновую систему дополнительного импульса накачки на частоте  $\nu_B$ , как функция временной раздвижки  $T$ . Б – Положение импульсов регистрации и накачки, действующих на спины А и В в спектре ЭПР

используется трехимпульсная последовательность PELDOR (3pPELDOR). На рис. 1А показана эта последовательность, состоящая из двух типов импульсов на частотах  $\nu_A$  и  $\nu_B$ . Импульсы  $\pi/2$  и  $\pi$  на частоте  $\nu_A$ , действующие на спины А в спектре ЭПР (рис. 1Б), используются для образования сигнала спинового эха от них, по которому регистрируется эффект PELDOR. Интервал  $\tau$  между импульсами на частоте  $\nu_A$  зафиксирован. В этом интервале расположен действующий на спины В  $\pi$ -импульс накачки на частоте  $\nu_B$  с задержкой  $T$ , отсчитываемой от первого  $\pi/2$ -импульса. Импульс накачки меняет ориентацию спинов В, что приводит к изменению дипольного взаимодействия между спинами А и В. Это изменение регистрируется как спад амплитуды сигнала спинового эха,  $V(T)$ , при изменении задержки  $T$  в интервале  $0 - \tau$ . Спад  $V(T)$  модулирован на частоте  $\nu_{dd}$ , что позволяет определить расстояние  $r$  между спинами. Модуляция в спаде сигнала PELDOR впервые обнаружена и исследована в работах [12, 13].

Используется также четырехимпульсная последовательность (4pPELDOR). В ней сигнал эха образуется под действием трех импульсов  $\pi/2$ ,  $\pi$ ,  $\pi$  на частоте  $\nu_A$ , а его изменение возникает за счет  $\pi$  импульса, приложенного в интервале между вторым и третьим импульсами на  $\nu_B$ .

Кинетика спада сигнала PELDOR для хаотически ориентированной пары спиновых меток с фиксиро-

ванным  $r$  в приближении достаточно коротких СВЧ импульсов описывается соотношением [4, 9]:

$$V(r, T) = 1 - p_b \{1 - f(r, T)\}, \quad (2)$$

где

$$f(r, T) = \langle \cos \left[ \left( \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) + J \right) T \right] \rangle_\theta. \quad (3)$$

Здесь  $p_b$  – вероятность поворота одного спина в паре импульсом накачки,  $\langle \dots \rangle_\theta$  означает усреднение по углу  $\theta$ . Интегрирование (2), (3) дает спадающую функцию, модулированную затухающими осцилляциями на частоте  $\omega_{dd}$  (рис. 2А, кривая 1). Фурье-анализ такого спада сигнала PELDOR дает так называемый пейковский дублет (рис. 2Б), что позволяет получить сведения о расстоянии  $r$  и об обменном интеграле  $J$  [4, 9], так как

$$\nu_{\parallel} = |2\nu_{dd} - J| \text{ и } \nu_{\perp} = |\nu_{dd} + J|. \quad (4)$$

При достаточно больших временах ( $T \rightarrow \infty$ ) функция  $V(r, T)$  стремится к предельному значению  $V_p$  (рис. 2А),

$$V_p = (1 - p_b)^{N-1} \approx 1 - (N - 1)p_b, \quad (5)$$

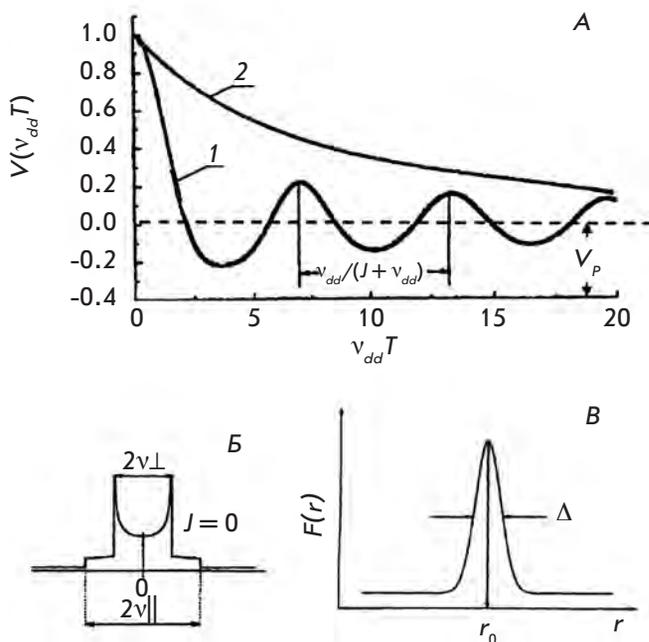
величина которого определяется числом дипольно взаимодействующих спинов  $N$  [4, 9], что позволяет определять число спин-меченых молекул в агрегатах и комплексах.

Максимальное расстояние, измеряемое методом PELDOR, определяется максимально длинным временем фазовой релаксации в исследуемой спиновой системе и обычно лежит в области  $\sim 8$  нм. Минимальное расстояние зависит от длительности импульса накачки и в оптимальных условиях эксперимента составляет  $\sim 1.5$  нм [4].

Расстояние в парах спиновых меток может быть по тем или иным причинам не фиксировано. В этом случае вводится функция распределения по расстояниям  $F(r)$  между метками (спектр расстояний), определяемая как  $F(r) = dn(r)/dr$ , где  $dn(r)$  есть доля пар спиновых меток в агрегате с расстоянием между метками в паре в диапазоне от  $r$  до  $r+dr$ . В случае непрерывного распределения по расстояниям, функция, описывающая спад сигнала PELDOR, может быть представлена как [14]:

$$V(T) = V_p + (1 - V_p) p_b \int_{r_1}^{r_2} F(r) f(r, T) dr. \quad (6)$$

Пределы интегрирования  $r_1$  и  $r_2$  в соотношении (6) ограничивают физически разумный диапазон рас-



**Рис. 2.** А – Спад сигнала PELDOR  $V(T)$ , модулированный частотой  $v_{dd} + J$  (кривая 1). Предельное значение спада  $V_p$  ( $T \rightarrow \infty$ ). Экспоненциальный спад сигнала PELDOR для парамагнитных частиц, равномерно распределенных в объеме (кривая 2). Б – Фурье-преобразование модулированного спада ( $J = 0$ ). В – Функция распределения спиновых меток по расстояниям  $F(r)$ ;  $r_0$  – расстояние в парах,  $\Delta$  – ширина функции  $F(r)$  на полувысоте

стояний между спиновыми метками. Соотношение (6) является уравнением Фредгольма первого рода, решение которого неустойчиво в силу погрешностей экспериментальной величины  $V(T)$ . Расчет  $F(r)$  сводится, по существу, к решению обратной задачи методами регуляризации Тихонова [15]. При этом необходимо иметь в виду, что сохраняются свойства неустойчивости решения. Методы расчета функции распределения по расстояниям в радикальных парах из экспериментальных данных PELDOR разработаны в [16–19], а для трех спиновых меток – в [20]. В работе [21] приведена программа расчета  $F(r)$  из кинетики спада  $V(T)$  сигнала PELDOR. Максимум функции  $F(r)$  соответствует расстоянию между спиновыми метками  $r_0$ , а ее ширина  $\Delta$  – пространственному разбросу расстояний (рис. 2В). Отметим, что в соответствии с (5), (6) расчет  $F(r)$  позволяет независимо определять  $N$  – число спинов в группе.

В реальных системах, содержащих группы спинов, имеются два типа дипольных взаимодействий: между парамагнитными центрами внутри группы,  $V(T)_{INTRA}$  и между парамагнитными центрами различных групп,

$V(T)_{INTER}$ . Выше рассмотрено дипольное взаимодействие внутри пар или внутри определенных групп спиновых меток. Если эти взаимодействия считать независимыми, то полная функция, описывающая спад сигнала  $V(T)$ , может быть представлена как [4, 9]:

$$V(T) = V(T)_{INTRA} V(T)_{INTER} \quad (7)$$

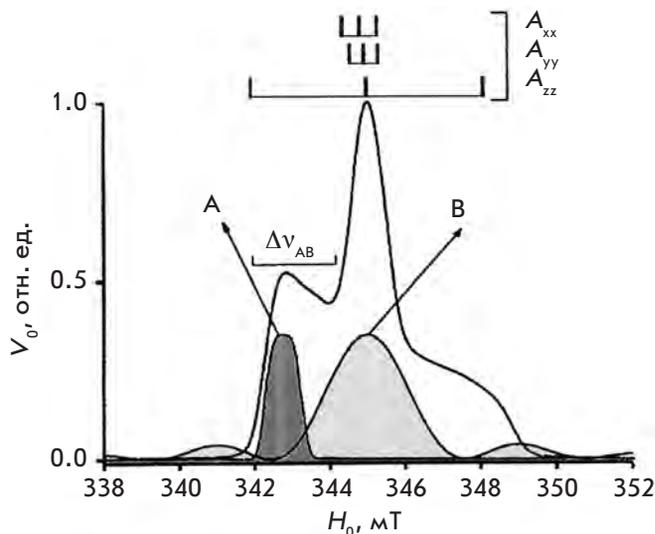
В большинстве случаев методом PELDOR изучают системы с равномерно распределенными в объеме спиновыми метками или группами меток. Для хаотически распределенных в трехмерном пространстве парамагнитных центров спад сигнала PELDOR описывается экспоненциальной функцией [4]

$$V_{INTER}(T) = V(0) \exp[-2p_b \Delta \omega_{1/2} T] = V(0) \exp[-\alpha T^A/3], \quad (8)$$

где  $\Delta \omega_{1/2} = 8.2 \times 10^{-13} C \text{ см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$  – дипольная ширина линии и  $C$  – концентрация парамагнитных центров (в  $\text{см}^{-3}$ ). Величины  $\alpha$  и  $A$  в общем случае зависят от размерности пространства. Например,  $A = 3$  для трехмерного пространства (рис. 2А, кривая 2),  $A = 2$  для плоскости,  $A = 1$  для линии [4, 9]. Возможен расчет величин  $\alpha$  и  $A$  для более сложных случаев пространственного распределения парамагнитных центров [22]. Сопоставление экспериментально найденных и расчетных величин  $\alpha$  и  $A$  открывает возможность исследовать особенности пространственного распределения методом PELDOR.

Разработаны методы, основанные на регистрации экспоненциального спада  $V(T)_{INTER}$  и его зависимости от концентрации парамагнитных центров, позволяющие разделить для дальнейшего анализа  $V(T)_{INTER}$  и  $V(T)_{INTRA}$  [23, 24].

Импульсы А и В действуют селективно в разных узких интервалах частот спектра ЭПР. Если величина анизотропии магнитно-резонансных параметров парамагнитных центров достаточно велика, как для нитроксильных спиновых меток, то возникает ориентационная селективность воздействия СВЧ-импульсов на спиновую систему. Эта селективность заключается в том, что по-разному ориентированные в пространстве радикалы в разной степени возбуждаются импульсами, формирующими сигнал спинового эха, и импульсом накачки. Теоретический анализ и эксперимент показали, что если проводить измерения, меняя положение импульсов А и В в спектре или  $\Delta v_{AB}$ , то можно из спадов сигнала PELDOR получать сведения о взаимной ориентации спиновых меток и их ориентации относительно вектора  $r$ , соединяющего пару меток [25–27]. Схема проведения таких экспериментов для типичного спектра ЭПР нитроксильной метки в 3-сантиметровом диапазоне длин волн показана на рис. 3.



**Рис. 3.** Схема, поясняющая проведение экспериментов по ориентационной селективности для нитроксильных меток. Спектр ЭПР определяется главными значениями тензора СВТ –  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$ ,  $A_{zz}$ . А, В – импульсы регистрации и накачки соответственно. Спад сигнала  $V(T)$  регистрируется при разных фиксированных значениях  $\Delta\nu_{AB}$  на крайней линии спектра, соответствующей крайней компоненте  $A_{zz}$

Развитые к настоящему времени теория и методы эксперимента PELDOR позволяют получать и исследовать строение и свойства многих биологически важных молекул. Ниже мы рассмотрим результаты изучения ДНК и РНК этим методом.

### PELDOR СПИН-МЕЧЕНЫХ ДНК И РНК

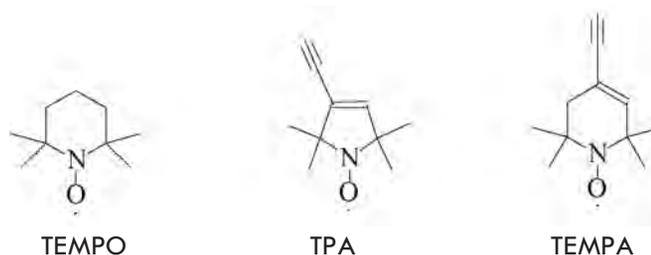
#### Спиновые метки для ДНК и РНК

Разработка способов направленного введения спиновых меток открыла целый каскад приложений метода ЭПР в биохимии и биофизике. Это – определение элементов вторичной и третичной структуры мембранных белков, включая влияние среды, исследование ориентаций и движения отдельных фрагментов белка в физиологических условиях, определение конформационных переходов в ходе функционирования белок-мембранных систем и многое другое.

Как правило, эти исследования выполняются с помощью традиционного стационарного метода ЭПР и систематически публикуются в серии сборников «Биологический магнитный резонанс» под редакцией Л. Берлинера и др. (к 2011 году вышло 28 книг). Ниже мы остановимся только на работах, связанных с применением метода PELDOR для изучения структур ДНК и РНК. Результаты первых исследований в этой области представлены в томах 19 и 21 этой серии [28, 29].

Важнейший этап этих работ, который по существу определил возможность их постановки и выполнения, – создание эффективных методов направленного синтеза спин-меченых биологически важных соединений. Серия методов решения этой задачи для нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов рассматривается в обзорах [30–32]. Недавно опубликован краткий обзор, посвященный методам введения спиновых меток в ДНК и РНК [33].

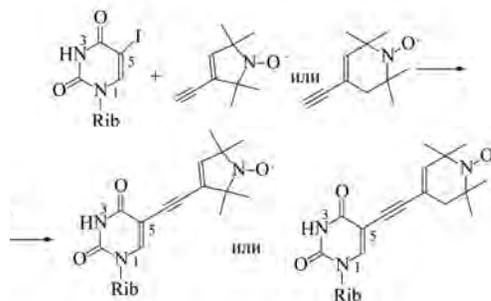
Наиболее популярные спиновые метки, используемые для мечения белков и нуклеиновых кислот, это 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксил (ТЕМРО), 2,2,5,5-тетраметилпирролин-1-оксил-3-ацетилен (ТРА) и 2,2,6,6-тетраметил-3,4-дегидропиперидин-N-оксил-4-ацетилен (ТЕМРА):



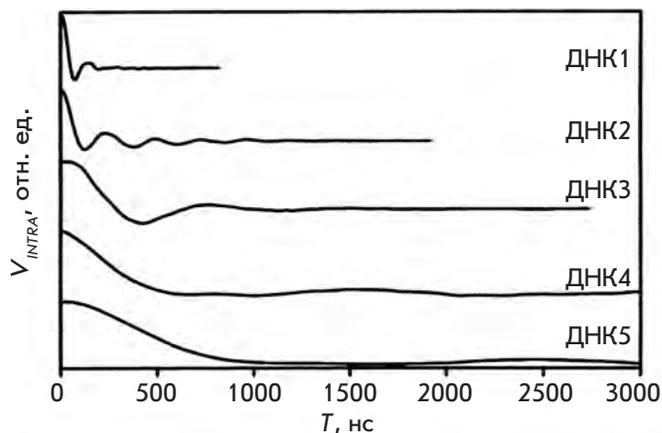
В них неспаренный электрон локализован на N–O-фрагменте.

В первых работах метку вводили по пятому положению остатков урацила в нуклеиновой кислоте [34]. Поскольку ограничение конформационной подвижности спиновых меток повышает точность определения расстояний методом PELDOR, в последние годы спиновые метки стали вводить в нуклеиновые кислоты на жестких линкерах. Один из таких методов, часто применяемых в настоящее время, – метод Соногаширы [35, 36], основанный на замещении йода в органическом соединении на алкинильный остаток. Реакция протекает при катализе солями Pd(II) и Cu(I). Применительно к нуклеиновым кислотам в положение С5 йод-уридина вводят остатки ТРА или ТЕМРА по реакции А [34, 37–40] с образованием аддуктов.

Реакция А:



где Rib – остаток рибозы.

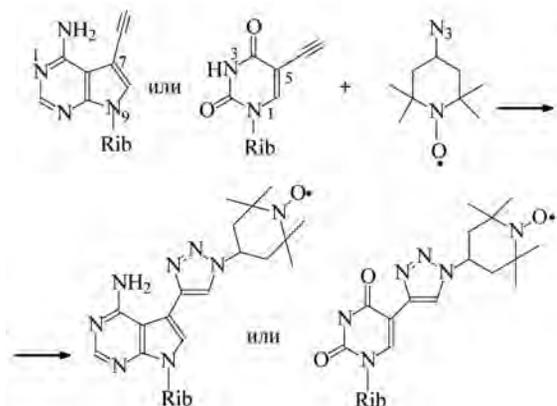


**Рис. 4.** Спады сигналов  $V_{INTRA}$  для пяти спин-меченых ДНК [46]. Глубина модуляции составляет 1, 17, 5, 20 и 20% для ДНК1–5 соответственно. (Воспроизведено с разрешения American Chemical Society.)

Этот метод позволяет вводить спиновые метки как в мономеры, применяемые в фосфитамидном методе синтеза олигонуклеотидов, так и в готовые рибо- и дезоксирибоолигонуклеотиды. С использованием реакции Соногаширы спиновая метка ТРА вводится также в защищенные по аминогруппам остатки аденина и цитозина в ходе синтеза рибоолигонуклеотидов [41].

В последнее время для введения спиновых меток в олигонуклеотиды широко применяют метод азид-алкинового циклоприсоединения, получивший название «химии защелки» («click chemistry») [42]. В этом случае спиновая метка вводится в олигонуклеотид по катализируемой Cu(I) реакции между ацетиленовой группой, введенной в гетероциклическое основание в положение C7 7-деазааденина или C5 урацила, и 4-азидо-ТЕМПО в растворе [43] или в ходе твердофазного синтеза олигонуклеотидов [44] с образованием аддуктов.

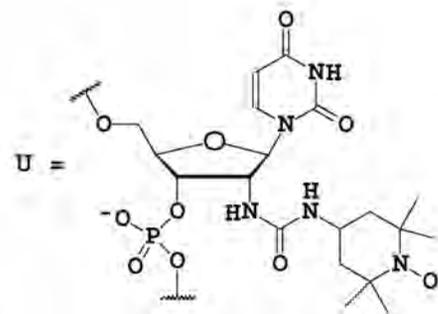
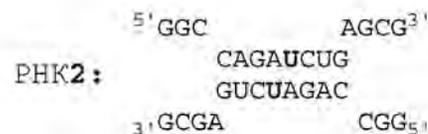
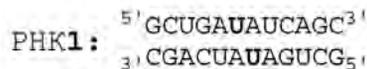
Реакция Б:



Эта реакция стереоспецифична, протекает с большим выходом и используется для синтеза спин-меченых ДНК и РНК.

**Линейные дуплексы нуклеиновых кислот**

Строение олигорибонуклеотидных дуплексов длиной 12 нуклеотидов (РНК1) и 15 нуклеотидов (РНК2) изучено в работе [45]. Метки TEMPO были введены по 2'-NH<sub>2</sub>-группам рибозы в остатках уридина (U) по реакции с изотиоцианатами TEMPO:



Модулированный спад сигнала PELDOR обнаружен только в случае РНК1. Фурье-анализ позволил определить расстояние между спиновыми метками –  $3.5 \pm 0.2$  нм. Для РНК2 обнаружен только экспоненциальный спад сигнала PELDOR, свидетельствующий о равномерном распределении спиновых меток, т.е. об отсутствии процесса образования дуплекса между спин-мечеными олигонуклеотидами РНК2 в водном растворе (буфер 0.1 М NaCl, 0.01 М Na-фосфат, 0.1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2) при концентрации 0.3 мМ. Это свидетельствует о возможном образовании внутримолекулярных шпильчатых структур, доминирующим над бимолекулярным процессом образования дуплекса.

При помощи 4pPELDOR-метода были определены расстояния между спиновыми метками ТРА, введенными по реакции А в остатки 2'-деоксиуридина (U) спиралей дуплекса ДНК [46]. Метки вводили в остатки U, расположенные в пяти разных местах дуплекса, так что число пар оснований, *n*, между метками было разным: *n* = 0, 2, 8, 10, 12 соответственно, для ДНК1–ДНК5, например (жирным выделены спин-меченые остатки U):

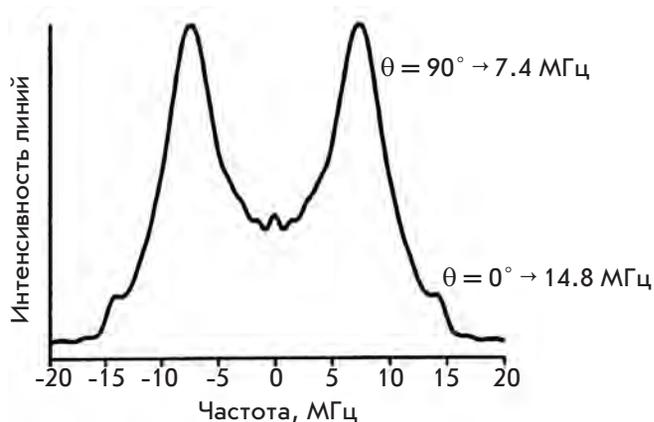


Рис. 5. Фурье-спектр, полученный из  $V_{INTRA}$  для ДНК1 [46]. Показаны линии, соответствующие  $v_{\perp}$  ( $\theta = 90^\circ$ ) и  $v_{\parallel}$  ( $\theta = 0^\circ$ ). (Воспроизведено с разрешения American Chemical Society.)

ДНК1 3' -GCGA**U**ACATGCG-5'  
5' -CG**S**T**A**UGTACGC-3'

ДНК5 3' -G**C**UGAC**T**ATATAG**T**CGC-5'  
5' -CGAC**T**GATATAT**C**AG**U**CG-3'

Исследовали замороженные (35 К) водные буферные растворы дуплексов с добавками 20% этиленгликоля для стеклования. Обнаружили модуляцию спада сигнала PELDOR для всех ДНК (рис. 4). Период биений спадов увеличивается с увеличением расстояния между спиновыми метками. Фурье-спектры во всех случаях представляют собой пейковский дублет. Пример такого дублета для ДНК1 приведен на рис. 5. Линии в этом дублете (на 7.4 и 14.8 МГц) соответствуют параллельной ( $\theta = 0^\circ$ ) и перпендикулярной ( $\theta = 90^\circ$ ) ориентации вектора, соединяющего спиновые метки  $r$  относительно направления внешнего магнитного поля. Используя соотношения (1) и (4), можно оценить расстояние между метками. В этом случае  $r = 1.92$  нм, а обменный интеграл  $J = 0$ .

Для ДНК2–ДНК5 расстояния, найденные из Фурье-спектра, оказались равными 2.33, 3.47, 4.48 и 5.25 нм соответственно. При помощи метода МД (молекулярная динамика) проведен расчет этих расстояний для исследованных спин-меченых ДНК [46]. Результаты сопоставления расчетных и экспериментальных значений с указанием возможных ошибок приведены на рис. 6. Коэффициент корреляции этих результатов составляет 0.997, что, как полагают [46], подтверждает наличие В-конформации в спирали дуплексов в замороженных водных растворах.

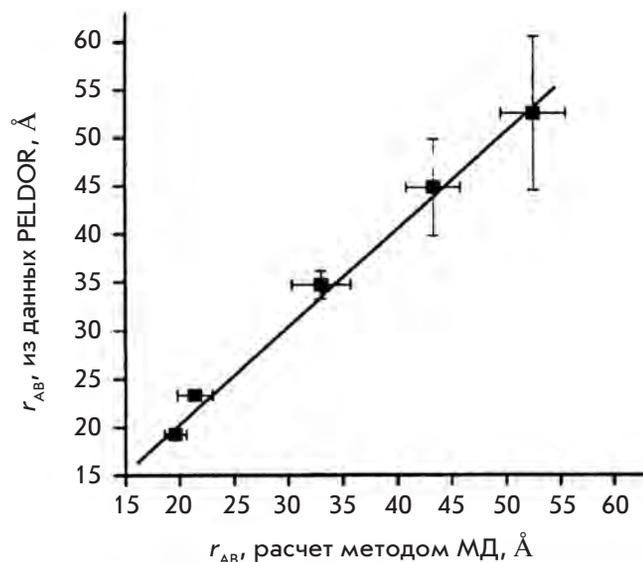


Рис. 6. Корреляция расстояний  $r_{AB}$ , полученных в эксперименте с ДНК1–ДНК5, с расстояниями, вычисленными для тех же ДНК методом МД [46]. (Воспроизведено с разрешения American Chemical Society.)

Детальное сопоставление методов PELDOR и FRET (fluorescence resonance energy transfer) [46] показало, что эти методы дополняют друг друга при исследовании спин-меченых систем.

Синтезированы шесть дуплексов РНК, меченых ТРА [41]. Достаточно глубокая модуляция, зарегистрированная на спадах сигнала PELDOR, позволила рассчитать функции распределения,  $F(r)$ , и определить с хорошей точностью расстояния в дуплексах, которые лежат в диапазоне от  $1.93 \pm 0.12$  до  $3.87 \pm 0.13$  нм, в зависимости от числа пар оснований между метками. Сравнение полученных в работах [41] и [46] результатов измерения расстояний в ДНК показывает, что при одинаковом числе пар оснований расстояния между метками в ДНК и РНК, которые находятся в разных спиралях дуплекса, различаются. Так, при нахождении меток в основаниях на расстоянии 10 п.н. значения в ДНК равны  $4.48 \pm 0.5$  нм, а в РНК –  $3.87 \pm 0.13$  нм [41]. Разница находится за пределами ошибки измерений и соответствует двум разным конформациям — А-форме в РНК и более растянутой В-форме в ДНК. Оказалось, что полученные результаты хорошо соответствуют расчетам расстояний методами МД, коэффициент корреляции составляет 0.976 [41]. Этот результат, по мнению авторов, позволяет считать, что дуплексы ДНК и РНК сохраняют свою конформацию в замороженных (40 К) водно-фосфатных буферных растворах.

В работе [47] метки ТРА вводили не в гетероциклическое основание, а в фосфоротиоатные группы ри-

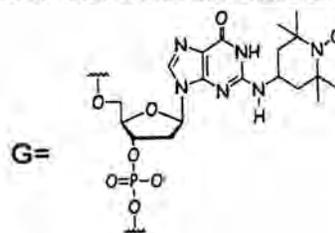
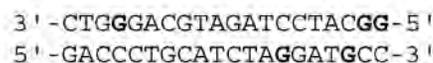
бозофосфатного остова через метиленовый линкер в определенные места дуплексных цепочек. После образования дуплексов из меченых в разных положениях полинуклеотидов открывается возможность определения расстояний для широкого набора радикальных пар. Используя приготовленные таким способом образцы (измерения проведены при 50 К в замороженных водных растворах дуплексов ДНК), методом PELDOR из положения максимумов функции парного распределения определены восемь расстояний между метками ДНК-дуплекса длиной 12 п.н. Минимальное и максимальное расстояния составляют соответственно 2.56 и 3.88 нм для ДНК. Метод введения меток не ограничивает, по мнению его авторов [47], длину полинуклеотида. В работе приведены данные для ДНК, содержащей 68 п.н. с метками, расположенными напротив друг друга на расстоянии 9 нуклеотидов от одного конца дуплекса. Найденное методом PELDOR расстояние (2.52 нм) соответствует расстоянию 2.5 нм, рассчитанному методом МД.

Авторы работы [47] полученные результаты измерений сопоставили с результатами расчетов с использованием данных спектроскопии ЯМР, учитывая возможные конформации рассматриваемой ДНК, и обнаружили отличную корреляцию ( $R^2 = 0.98$ ) между результатами PELDOR-измерений и расчетом. По их мнению, предложенный метод введения меток может широко использоваться в структурных исследованиях комплексов ДНК и РНК с белками.

Близка по постановке к [47] работа [48], где спиновые метки вводили также в фосфоротиоатные группы РНК, а данные о шести расстояниях в парах в диапазоне 2.5–4.72 нм сравнивали с результатами рентгеноструктурного метода. Обнаружена уверенная корреляция между этими измерениями с  $R^2 = 0.97$ . Это свидетельствует о том, что введение такой метки не меняет существенно строения РНК.

В рассмотренных выше исследованиях показано, что разработанные методы введения спиновых меток в линейные дуплексы ДНК и РНК позволяют достаточно точно (~ 1%) определять расстояние между спин-мечеными нуклеотидами. Важным результатом является достаточно строгая корреляция между результатами PELDOR и рассчитанными методами МД. Расчеты проводились, как правило, для равновесных водных растворов при комнатных температурах, а измерения PELDOR – для быстро замороженных стеклообразных растворов. Можно заключить, что при замораживании мгновенно фиксируется конформационное состояние, существующее при комнатных температурах в исследуемых ДНК и РНК. Это обосновывает возможность изучения методом PELDOR ДНК и РНК в различных окружениях и в ходе разных взаимодействий и реакций.

При переходе от В- к А-конформации ДНК меняются расстояния между нуклеотидами. Такое изменение зафиксировано и исследовано методом PELDOR [49]. В этом случае изучены спин-меченые комплементарные дуплексы ДНК:

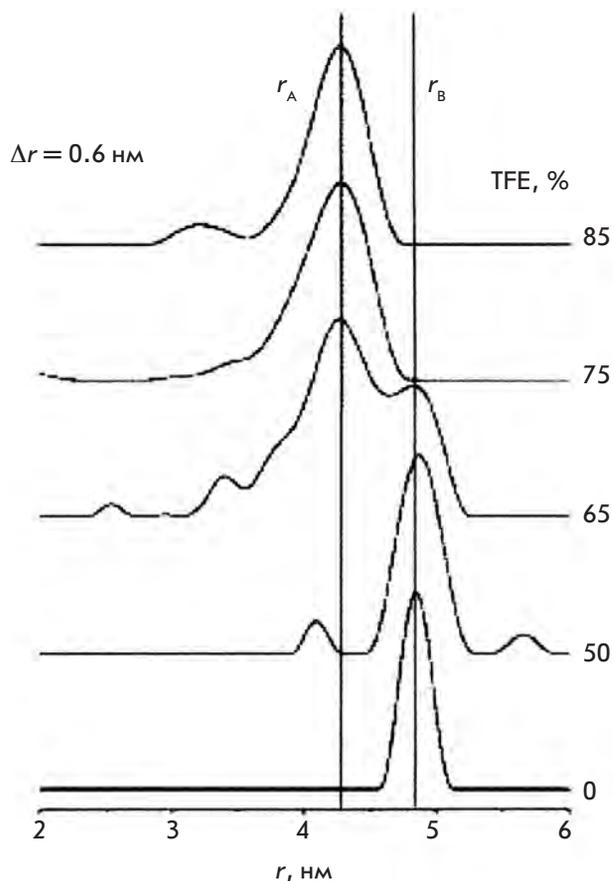


Метку 4-амино-ТЕМПО вводили по атому N2 остатков гуанина, расположенных либо в одной (верхней) спирали (положения (4; 19), (4; 20)), либо в обеих спиральях. В последнем случае метки занимали положение (4; 14') или (4; 18') в разных спиральях.

Переход между В- и А-формами ДНК происходит в полярных средах. Спин-меченые дуплексы ДНК исследовали при температурах 60–70 К в водном буфере с добавками 10% (объемных) криопротектора – глицерина. В качестве добавок, стимулирующих переход В → А, использовали трифторэтанол (ТФЕ). На рис. 7 показано как меняется спектр расстояний при различном объемном содержании ТФЕ. Форма В переходит в форму А при концентрациях, соответствующих более 70% ТФЕ. Разница между средними расстояниями для А- и В-форм составляет 0.8 нм. В табл. 1 приведены расстояния между метками для всех исследованных образцов ДНК в А- и В-формах. Здесь же, для сопоставления, приведены результаты расчета методом МД расстояний между атомами кислорода в группах >NO спиновых меток в исследованных дуплексах.

**Таблица 1.** Экспериментальные и расчетные расстояния между спиновыми метками (нм) для А- и В-форм ДНК [49]

ДНК-дуплекс	PELDOR	В-форма, О-О-расстояние, расчет МД	PELDOR	А-форма, О-О-расстояние, расчет МД
(4;20)	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.5 ± 0.4
(4;19)	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.3	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.4
(4;18')	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4
(4;14')	3.2 ± 0.2	3.6 ± 0.3	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.3

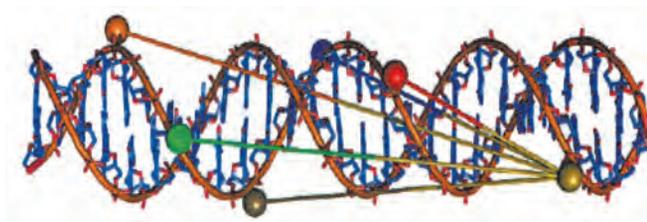


**Рис. 7.** Изменение спектра расстояний при добавлении TFE в водный раствор ДНК-дуплекса с метками в положениях (4;18') [49]. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons, Inc.)

Чувствительность к определению расстояний в нанометровом диапазоне в PELDOR, согласно [49], значительно выше, чем в других методах, таких, как стационарный ЭПР или метод кругового дихроизма (КД). Это позволяет ставить задачи по исследованию переходов между различными конформерами А- или В-форм РНК или ДНК в различных условиях молекулярного окружения и полярности.

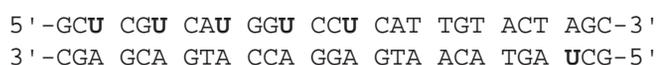
При помощи расчета методом МД показано [50], что, если спиновая метка типа ТРА находится в большой бороздке ДНК или РНК, то изменяется взаимная ориентация пары оснований в молекуле. Этот эффект менее существен для меток, расположенных в малой бороздке. Тем не менее конформационные изменения, возникающие при введении меток в ДНК и РНК, следует учитывать при интерпретации ориентационных эффектов PELDOR.

Измерены расстояния между спиновыми метками в четырех гибридных ДНК/РНК-дуплексах [51].



**Рис. 8.** Показаны пары спиновых меток в ДНК-дуплексах, расстояния между которыми определены в [52]. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons, Inc.)

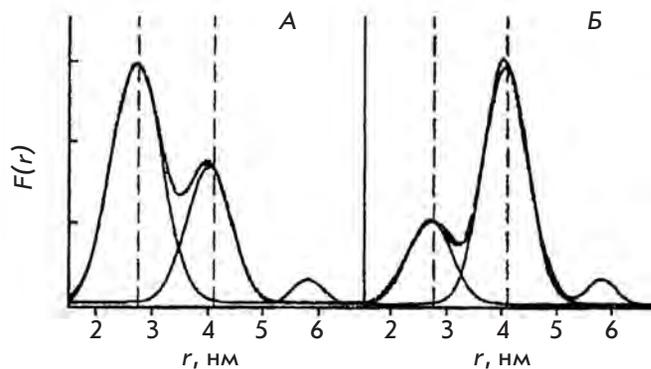
Спиновые метки ТРА вводили в гетероциклические основания таким образом, чтобы они были ориентированы либо в большую, либо в малую бороздку дуплекса. Это позволило сделать выбор между А- и В-конформациями гибрида. Как оказалось, в одной половине случаев это была В-, а в другой скорее А-конформация. При взаимодействии достаточно длинных дуплексов ДНК и РНК с белками и мембранами возможно образование конформационных изгибов и нарушений линейной структуры, появление различно ориентированных в пространстве коротких дуплексных участков. Такая гетерогенная система смоделирована смесями ДНК-дуплексов одинаковой длины со спиновыми метками в разных участках [52]. Спиновые метки в этой работе последовательно вводили по реакции с изоцианатом ТЕМРО в 2'-аминогруппы остатков уридина ДНК-дуплексов таким образом, чтобы расстояние между метками составляло 9, 12, 15, 18 или 21 п.н.:



(жирным обозначены нуклеотиды, в которые вводились спиновые метки).

Всего синтезировано пять дважды спин-меченых дуплексов. Оптимально приготовленные образцы (исследовали замороженные при 77 К растворы ДНК) для X-диапазона PELDOR-спектрометра (достаточно высокое соотношение сигнал/шум, большое время релаксации  $T_f \approx 8$  мкс) содержали  $12.5 \times 10^{-6}$  моль л<sup>-1</sup> дуплекса ДНК в 50% растворе дейтерозэтиленгликоля в D<sub>2</sub>O. На рис. 8 схематично показаны пары спиновых меток, расстояния между которыми определены в различных дуплексах.

Регистрировали спад сигнала PELDOR и анализировали функции распределения по расстояниям  $F(r)$ , рассчитанные методом регуляризации Тихонова [15]. Определено шесть расстояний между метками в диапазоне 2.8–6.8 нм. Наибольший интерес вызы-



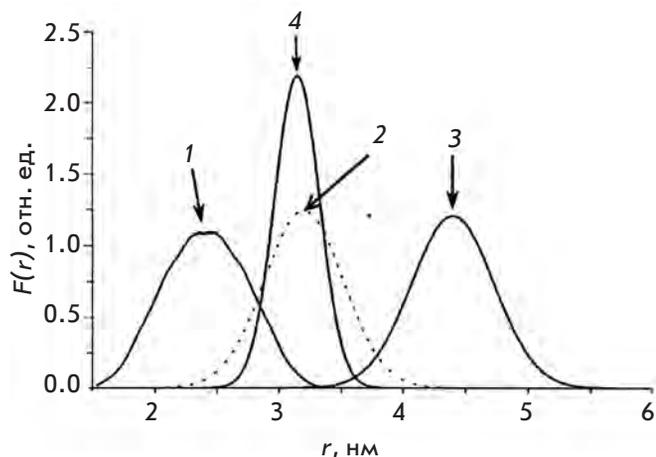
**Рис. 9.** Изучение смесей спин-меченых дуплексов. Функции распределения по расстояниям для смеси дуплексов с расстояниями между метками 2.8 и 4.1 нм. А – Смесь в соотношении 3/1; Б – та же смесь в соотношении 1/3 [52]. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons Inc.)

вают результаты изучения смесей указанных выше спин-меченых дуплексов (рис. 9). Установлено [52], что в случае смеси из двух различных дуплексов деконволюция сложной функции  $F(r)$  путем введения для каждого из дуплексов функции распределения в виде гауссовской кривой позволяет с хорошей точностью определить среднее расстояние в каждом дуплексе и его концентрацию в смеси. В то же время в смесях, содержащих большее число дуплексов, при анализе таких  $F(r)$  возникают трудности, связанные, по-видимому, как с неточностями и неоднозначностью решения обратной задачи восстановления  $F(r)$  из кинетики  $V(T)$ , так и с возможными превращениями под влиянием, например, стэкинг-взаимодействий в сложной смеси, меняющими пространственную геометрию дуплексов [52].

Дуплексы, содержащие мисматчи (неканонические пары) АА и ТТ, изучены в работе [53]. Две спиновые метки ТЕМРО были введены по реакции каталитического циклоприсоединения («click chemistry») в один из олигонуклеотидов по разные стороны от мисматчей:



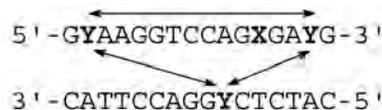
где  $\overset{*}{\text{A}}$  – 7-деазааденозин, содержащий при С7 спиновую метку ТЕМРО; XY – неканоническая пара dA × dA или dT × dT в положениях 8 или 9 дуплекса. В каноническом дуплексе, когда XY/ZW = AT/TA, расстояние между спиновыми метками составляло 1.83 нм. В дуплексах ТТ/ТА и АТ/АА, содержащих



**Рис. 10.** Функция распределения по расстояниям  $F(r)$  для ДНК-дуплекса с тремя метками (1, 2, 3) и для дуплекса с двумя метками (4), возникающего в результате деградации ДНК под действием фермента *Endo IV* [54]. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons, Inc.)

неканоническую пару ТТ или АА в положении 8, расстояние между неспаренными электронами составило 1.73 нм. Если дуплексы содержали неканонические пары в 9-м положении, дуплексы АТ/ТТ и АА/ТА, то расстояние между спиновыми метками составило 1.87 и 2.08 нм соответственно. Таким образом, введение неканонической пары в 8-е положение уменьшает расстояние между метками, а в 9-е – увеличивает по сравнению с каноническим дуплексом. Следовательно, появление мисматча в ДНК влияет на структуру соседних пар оснований, вызывая их сближение или расхождение.

Исследованы также ДНК-дуплексы, содержащие три спиновых метки ТЕМРО [54]. Эти метки Y были введены в алкинил-олигонуклеотид по атомам С5 остатков уридина с помощью метода «click chemistry». В одну из цепей ДНК, кроме двух спиновых меток, введена также тетрагидрофурановая вставка X (дефект ТНФ, см. ниже табл. 3 и 5). Таким образом, исходная система в буферном растворе содержала три спиновых метки и один дефект в дуплексе.



Спады сигналов PELDOR в такой трехспиновой системе анализировали стандартным методом [21], модифицированным для трехспиновой системы [20]. Как и следовало ожидать, спектр расстояний в такой



измерения спадов сигналов PELDOR для разных значений разности частот ( $\Delta\nu_{AB}$ ) в диапазоне от 90 до 40 МГц с шагом 10 МГц. Положение второй метки в исследуемой серии образцов ДНК варьировало от  $N3$  до  $N14$  (рис. 11А). Полученные в результате данные для угла  $\beta$  в ДНК с разным положением меток приведены на рис. 11Б. Как показано на этом рисунке, этот угол, рассчитанный из геометрии дуплекса ДНК, полностью согласуется с определенным экспериментально. Полученные результаты открывают возможность изучения ориентации спиновых меток в более сложных структурах, чем линейные одно- и двухцепочечные ДНК и РНК.

Динамические свойства молекул нуклеиновых кислот имеют важное значение для понимания кинетики и механизмов таких клеточных процессов, как репликация и транскрипция, когда ДНК закручивается и изгибается при взаимодействии с активными центрами белков. Изучение механизмов молекулярной динамики нуклеиновых кислот является одной из актуальных задач современной биофизики. На ранних этапах теоретических и экспериментальных исследований считалось, что динамические свойства ДНК-дуплексов могут быть описаны моделью эластичного цилиндра [58]. Различные современные физические методы, применяемые для изучения механизмов подвижности ДНК-спирали [59–61], позволили сформулировать по крайней мере три возможных типа движений – изменение шага дуплекса без изменения радиуса спирали (А), изменение радиуса спирали с постоянным шагом спирали – растягивание и закручивание (В) и изгиб спирали без изменения радиуса и шага (С).

Выше мы неоднократно отмечали, что ширина линий в спектре расстояний, полученном из экспериментов PELDOR при низких температурах в замороженных стеклах, коррелирует со спектром возможных конформационных состояний спиновой системы, рассчитанным для той же системы современными методами МД в жидкости. Это означает, что PELDOR дает мгновенные снимки динамической ситуации данной молекулярной системы.

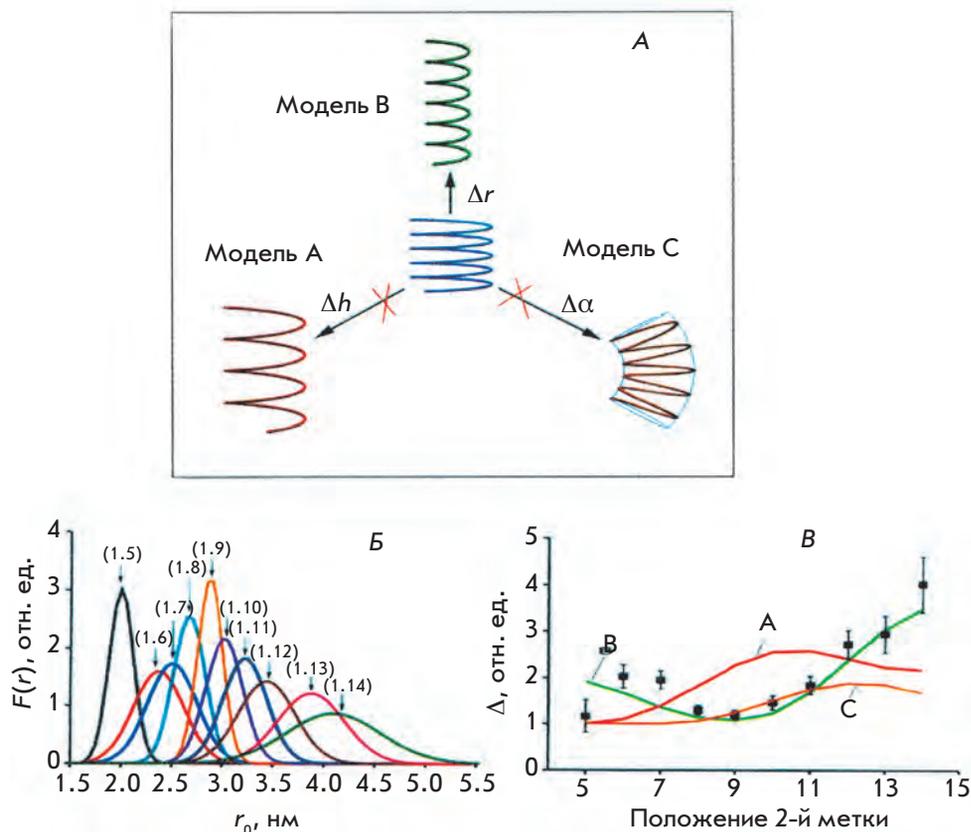
Используя такие возможности PELDOR, авторы [62] решили попытаться разделить механизмы А, В, С, исследуя конформационную гибкость дважды спин-меченой ДНК (20 нуклеотидов). Жесткие спиновые метки типа  $\zeta$  были введены в нуклеотиды дуплекса. Метки вводили попарно в 10 дуплексов таким образом, чтобы положение одной из меток фиксировалось на одном конце дуплекса, а расстояние  $R$  до других последовательно увеличивалось на шаг одного витка спирали. Измерения PELDOR проведены на частотах диапазонов X (9 ГГц) и G (180 ГГц). Измерены спады сигналов PELDOR и их

зависимость от  $\Delta\nu_{AB}$  для всех дуплексов от (1.5) до (1.14), определена ширина линий  $\Delta = \langle \Delta R^2 \rangle^{1/2}$  в спектре расстояний в гауссовском приближении для  $F(r)$  (рис. 12А). Ширину линий определяли усреднением данных по ориентационной селективности [26], что исключило корреляцию в ориентациях меток при определении расстояний между ними. При исследовании ориентационной селективности на разных  $\Delta\nu_{AB}$  методами, изложенными в [25–27], определили взаимные ориентации меток для всех спиновых пар. Важным этапом работы стал теоретический расчет модулированных спадов сигнала PELDOR, ширины линий функции  $F(r)$  и взаимной ориентации меток для различных моделей движения А, В, С.

Оказалось, что только для В-модели (закручивание спирали) зависимость ширины функции распределения от положения метки описывает данные эксперимента (рис. 12Б). Закручивание и растягивание спирали в этой модели идентифицируется по данным ориентационной селективности, полученным в экспериментах на 180 ГГц. Оказалось, что вариации угла между направлениями по N–O-связи для ближайших меток составляет  $\pm 22^\circ$ .

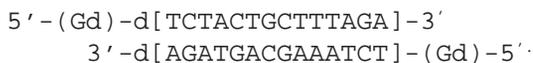
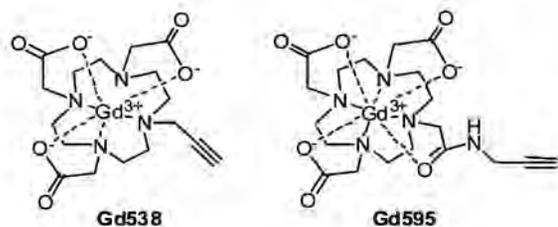
Полученные результаты, как отмечено в [62], находятся в полном соответствии с моделью кооперативных флуктуаций, так называемой моделью «дыхательных» движений ДНК-дуплекса, когда шаг спирали остается постоянным, а радиус спирали и длина молекулы ДНК изменяются коррелированно. По данным PELDOR, радиус спирали изменяется на 11%, а длина ДНК может меняться на  $\pm 6\%$ . Все эти результаты PELDOR коррелируют с данными малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXSI) [61] и с результатами, полученными методом флуоресцентной микроскопии [59] для коротких ДНК-полинуклеотидов. Следует отметить, что широкий набор экспериментальных подходов (уникальный набор спин-меченых ДНК, изучение ориентационной селективности, измерения в разных диапазонах частот), использованных в этой работе [62], по-видимому, впервые показал возможности метода не только в структурных исследованиях, но и в изучении деталей динамики биомолекул.

В последнее время предложены спиновые метки – комплексы Gd(III) [63–65] или Cu(II) [66]. У таких меток обычно спектр ЭПР в полиориентированных системах достаточно сложен. Но в случае Gd(III) при измерениях на высоких частотах  $\sim 30$  ГГц ( $K_a$ -диапазон) и при криогенных температурах  $\sim 10$  К в спектре преобладает одна линия, соответствующая  $-1/2 \rightarrow +1/2$ -переходу, которая и используется в PELDOR-экспериментах. С использо-



**Рис. 12.** А – Три модели кооперативных движений в двухцепочечной ДНК (см. текст). Б – Функции распределения по расстояниям, найденные в приближении гауссовского распределения из данных по ориентационной селективности для указанных на рисунке (в скобках) пар спиновых меток типа  $\zeta$  в ДНК-дуплексах. В – Зависимость ширины линии распределения по расстояниям  $\Delta = \langle \Delta R^2 \rangle^{1/2}$  от расстояния между метками (эксперимент) и теоретически рассчитанные кривые для механизмов подвижности А, В, С. Минимальное значение  $\Delta$  соответствует расстоянию между метками 1 и 9 в ДНК [62]. (Воспроизведено с разрешения American Chemical Society.)

ванием в качестве меток комплексов Gd(III) (Gd538 и Gd595), введенных в концевые тимидины методом «защелки», изучена структура дуплекса, содержащего 14 п.н. [65]:



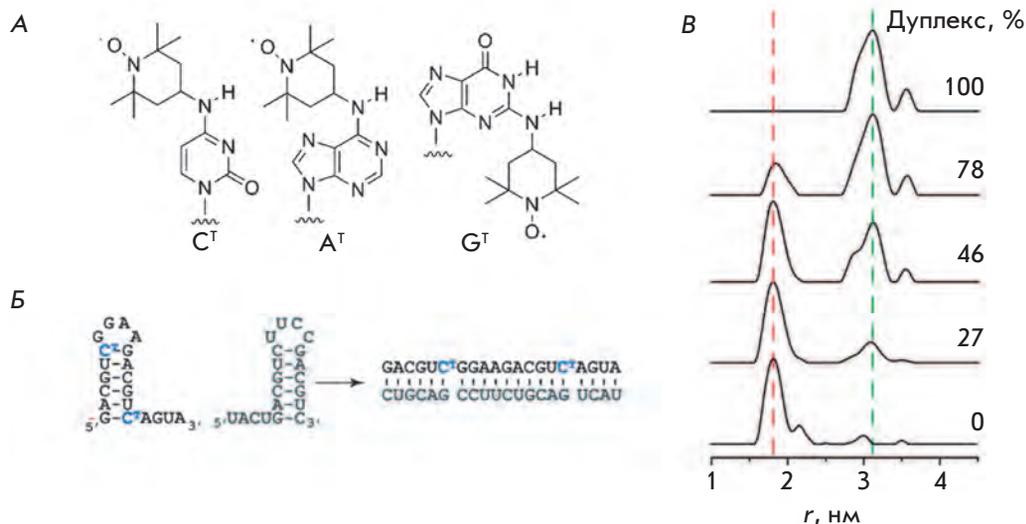
Измерения, проведенные методом 4pPELDOR, для этих комплексов ДНК дали расстояние между ионами около  $5.9 \pm 1.2$  нм при ширине функции распределения по расстояниям  $\sim 2$  нм. Авторы [65] считают, что использование этих ионов позволит расширить диапазон измеряемых методом PELDOR расстояний до  $\sim 10$  нм, что существенно в случае конформаций сложных биомолекул. Очевидный недостаток таких меток по сравнению с нитроксильными – доста-

точно большое расстояние (1.2–1.5 нм) между ионами и местом их присоединения к исследуемой молекуле, что приводит за счет подвижности таких меток к широкому распределению по расстояниям и снижению точности измерений. Отметим, что ряд особенностей методов анализа PELDOR-эксперимента для Gd(III) и Cu(II) детально рассмотрен в [65] и [66] соответственно.

### Нелинейные дуплексы и третичные структуры ДНК и РНК

Вторичная структура ДНК и РНК может иметь вид не только линейной спирали, но и принимать более сложные конфигурации, относимые к третичной структуре биополимеров. Достаточно длинные одноцепочечные РНК, изгибаясь на  $180^\circ$ , образуют дуплексы своими комплементарными участками, в то время как некомплементарные участки образуют кольца, шпильки, петли, содержащие несколько нуклеотидов. Расстояния в таких вторичных структурах будут отличаться от расстояний между нуклеотидами в обычных спиральных.

Так получены данные о расстояниях в шпильчатой структуре спин-меченых РНК, содержащих 20 нуклеотидов [67]. Нитроксильные метки ТЕМРО



**Рис. 13.** Исследование шпильчатых структур в РНК методом PELDOR [67]. А – Спин-меченые нуклеозиды А<sup>\*</sup>, С<sup>\*</sup> и G<sup>\*</sup>. Б – Образование дуплекса РНК из двух шпилек, одна из которых содержит С<sup>\*</sup>. В – Изменение функции распределения по расстояниям в смесях, содержащих разное количество спин-меченой РНК. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons, Inc.)

вводили непосредственно в NH<sub>2</sub>-группы гуанина, аденина и цитозина определенных нуклеотидов одноцепочечной РНК (рис. 13А). При этом число нуклеотидов между метками было фиксированным и равным 10. Методом PELDOR определяли расстояние между метками при образовании комплементарной спирали спин-меченой и немеченой РНК, а также в шпильчатых структурах. В первом случае, независимо от типа нуклеотида и положения пары меток в дуплексе РНК, расстояние между метками оставалось одинаковым, равным 3.1 нм, что соответствует расчетным величинам для А-формы дуплекса.

В шпильчатой структуре РНК, состоящей из 20 нуклеотидов, шесть комплементарных нуклеотидов образуют двойную спираль (стебель шпильки), четыре – петлю, остальные – моноспираль. При добавлении в систему полностью комплементарной РНК без спиновых меток формировался дуплекс, в котором метки находились только в одной цепи (рис. 13Б). Методом PELDOR проведены эксперименты с образцами, содержащими разное количество спин-меченой РНК. Функции распределения по расстояниям, полученные в этих экспериментах (рис. 13В), подтвердили существование в замороженных буферных растворах как спин-меченых шпилек с расстояниями между метками 1.8 нм, так и дуплексов с расстояниями 3.1 нм.

Одиночные РНК могут образовывать не только шпильки, но и более сложные структуры типа колец (или полуколец) в сочетании со шпильками. Такие элементы структуры могут акцептировать некоторые молекулы, они носят название «РНК-переключатели» (RNA riboswitches) и играют важ-

ную роль в механизмах, контролирующих передачу генетической информации в клетках.

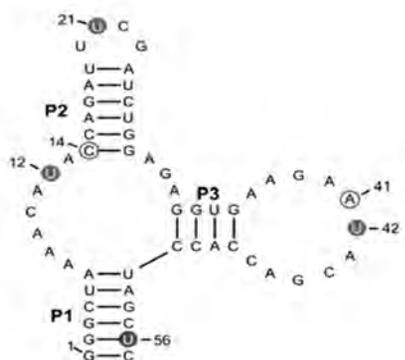
Методом PELDOR изучены акцептирующие неомицин искусственно синтезированные РНК-переключатели, состоящие из 27 нуклеотидов [68]:



Спиновые метки ТРА были введены в остатки урацила (выделены жирным). Определяли расстояния между парами в положениях 4-14, 4-15, 14-26, 15-26. Сделана попытка определить изменения конформации переключателя при образовании его комплекса с неомицином [68]. Оказалось, однако, что функция распределения по расстояниям  $F(r)$  между спин-мечеными уридинами в таком комплексе практически не меняется по сравнению с исходной структурой РНК-переключателя. Это, по мнению авторов [68], указывает на конформационную стабильность структуры.

Изучена структура еще одного фрагмента, способного выполнять функции РНК-переключателя и/или РНК-аптамера по отношению к молекулам тетрациклина (Тс) [69]. Спиновые метки вводились в синтетический 57-звенный рибоолигонуклеотид либо по реакции (1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-метил)-метантиосульфата с 4-тиоуридином, либо по реак-

ции 4-изоцианато-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксида с 2'-аминогруппами рибозы.



Здесь закрашенные круги – спин-меченые 4-тиоуридины, незакрашенные – спин-меченые по 2'-аминогруппами нуклеотиды.

Предполагаемая структура данного РНК-фрагмента содержала три стебля, P1, P2 и P3, и три петли. Методом PELDOR измерены расстояния между спиновыми метками, введенными в положения (U12/U21), (U12/U56), (U42/U56) и (C14/A41) в отсутствие и в присутствии Тс. Установлено, что свободный РНК-аптамер существует в двух конформациях. В присутствии лиганда Тс происходит сдвиг равновесия в сторону одной из конформаций.

Сообщается о первой попытке исследовать с помощью PELDOR влияние внутриклеточного окружения на спин-меченые ДНК и РНК-структуры [70, 71]. В обеих работах, которые появились почти одновременно, изучали поведение спин-меченых нуклеиновых кислот в относительно больших клетках (диаметром ~ 1 мм) – ооцитах *Xenopus laevis*.

В работе [70] изучали 12-звенный ДНК-дуплекс, 14-нуклеотидную РНК-шпильку и 27-мерный РНК-переключатель, чувствительный к неомицину (табл. 2). Спиновую метку ТРА вводили в гетероциклические основания по реакции Соногаширы. Для проведения PELDOR-экспериментов использовали примерно по 50 клеток, в каждую из которых

при помощи микроинъекций вводили по 30–50 нл 2.5–5.0 мМ свободной спиновой метки или дважды меченной нуклеиновой кислоты. На это требовалось около 10 мин. Затем клетки отмывали буфером, переносили в ЭПР-кювету, замораживали в жидком азоте и проводили измерения.

Расстояния между спиновыми метками в РНК-шпильке и неомициновом рибопереключателе не зависели от того, где находился образец – в ооцитах или вне клетки (в буфере). Это означает, что данные РНК имеют жесткие структуры, одинаковые *in vivo* и *in vitro*. В противоположность этому расстояние между метками в коротком ДНК-дуплексе зависело от условий, в которых находился образец: в растворе или в клетке. В растворе расстояние между спиновыми метками было меньше, чем в клетке. Объяснением этому, по мнению авторов, было наличие стэкинга оснований при нахождении дуплекса в растворе и нарушение стэкинга, если ДНК находится в клетке и взаимодействует с клеточными белками и другими молекулами.

В работе [71] метку ТЕМРА присоединяли по реакции Соногаширы к концевым остаткам тимидина каждой цепи (обозначены жирным шрифтом) ДНК-дуплекса:



Такой спин-меченый дуплекс вводили путем микроинъекции в ооциты *X. laevis*. Сравнивали между собой замороженные при 45 К клетки и буферный физиологический раствор, содержащие спин-меченые ДНК. В обоих случаях после замораживания концентрация парамагнитных частиц существенно уменьшалась, что не помешало оценить расстояние между метками в ДНК в буфере – 3.20 нм, а в клетках – 3.22 нм. Главный эффект состоял в существенном увеличении ширины функции распределения. В буфере эта величина составляла 0.43 нм,

Таблица 2. Нуклеиновые кислоты, исследуемые в [70]

Образец	Нуклеотидная последовательность*
РНК-шпилька (U6–U11)	5'-GGC-ACU-UCG-GUG-CC-3'
Неомициновый рибопереключател (U14–U26)	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GUC-3'
ДНК-дуплекс	5'-GCT-GAT- <b>ATC</b> -AGC-3' 3'-CGA-CTA- <b>TAG</b> -TCG-5'

\*Жирным выделены нуклеотиды, по которым вводилась спиновая метка.

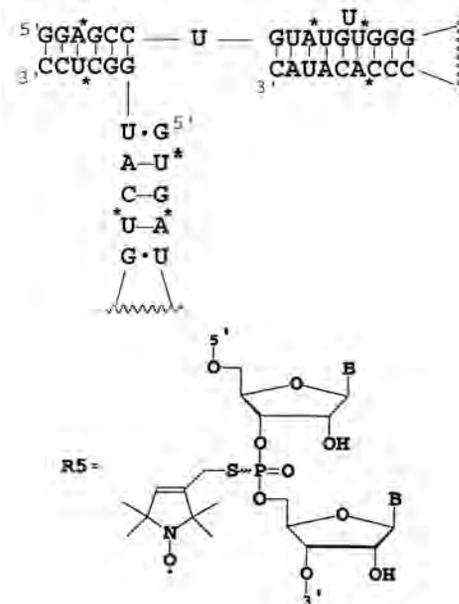
а в клетках увеличивалась до 1.04 нм. Судя по представленным данным PELDOR, последняя величина может быть и большей, т.е. соответствовать практически равномерному распределению спинов. Этот эффект обусловлен, по-видимому, [71] достаточно быстрой деградацией ДНК в клеточной среде, протекающей до замораживания образцов.

Одной из главных проблем таких весьма актуальных исследований остается повышение стабильности спиновых меток в клеточной среде. Возможен и переход к опытам, значительно сокращающим время от введения в клетку раствора спин-меченой ДНК до замораживания.

Многие из функциональных ДНК и РНК образуют специфические третичные структуры, строение и динамика которых определяют их функционирование. В таких третичных структурах расстояния между введенными спиновыми метками зависят как от конформации биополимера, так и от пространственной ориентации отдельных его звеньев.

Изучено также влияние ионов  $Mg^{2+}$  на рибозим, имеющий разветвленную структуру «головки молотка» («hammerhead ribozyme», HHRz) [72]. Определены функции распределения по расстояниям для спиновых меток ТЕМРО, введенных в различные петли структуры HHRz. Показано, что при введении в раствор HHRz ионов  $Mn^{+2}$  в зависимости от концентрации  $Mn^{+2}$  возрастает количество рибозимов, имеющих петли с наименьшим расстоянием ~ 2.4 нм между метками. Предполагается, что именно такие комплексы РНК с ионами металлов участвуют в каталитическом процессе разрезания РНК.

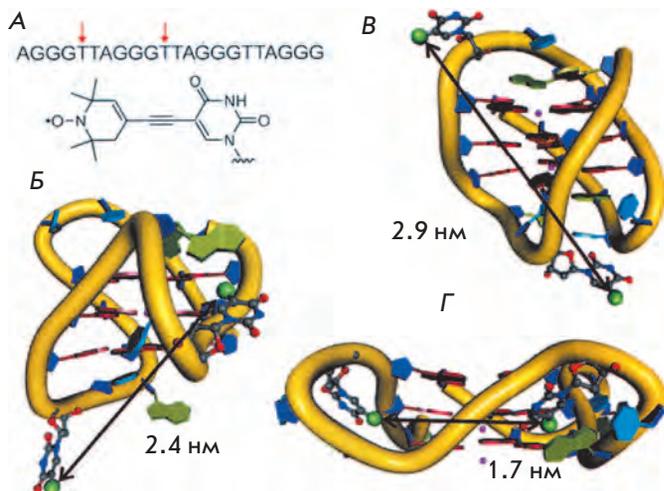
Изменение расстояний между спиновыми метками за счет конформационных превращений оценили методом PELDOR и в других сложных РНК и ДНК с различными третичными структурами, например РНК, содержащую трехспиральное сочленение (three-way-junction) [73]. Подобная структура образуется в упаковочном моторе (packaging motor) бактериофага φ29 при упаковке двухцепочечной геномной ДНК в предформированный капсид. Упаковочный мотор – это РНК-белковый комплекс, использующий энергию гидролиза АТФ для конденсации геномной ДНК. Структура РНК, входящей в состав этого мотора, изучена недостаточно, поэтому интересно было исследовать ее методом PELDOR. Эта РНК представляет собой димер, структуру которого рассматривали ранее в качестве возможного интермедиата, образующегося в данном процессе. Спиновые метки R5 вводили по межнуклеотидным фосфотиоатным группам. Ниже изображен элемент этой структуры, где указаны положения, по которым вводили спиновые метки (обозначены звездочками):



Были измерены 17 расстояний между парами спиновых меток. Анализ этих данных позволил определить возможные пространственные ориентации трех спиралей в упаковочном моторе. Показано, что две из трех спиралей РНК этой структуры образуют острый угол по отношению друг к другу, что не согласуется с ранее предложенной моделью, в которой эти спирали состыковываются вдоль одной линии. Данная работа показала большие возможности метода, использованного для изучения пространственной геометрии сложных структур РНК.

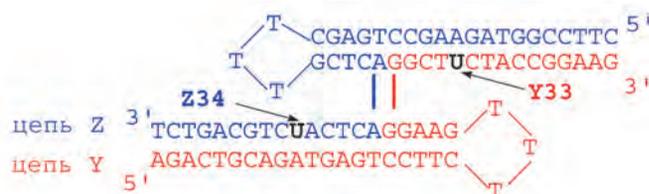
Метод PELDOR применили для изучения конформации квадруплексов, образующихся в теломерных последовательностях на концах хромосом [74] (у человека они состоят из повторяющихся участков GGGTTA [75]). Исследовали структуру дважды ТЕМРА-меченного олигонуклеотида, формирующего квадруплекс, в котором спиновые метки введены в положения 5 и 11 олигонуклеотида (рис. 14А) [74]. Доказано, что в растворе, содержащем ионы  $K^+$ , существует смесь двух структур – антипараллельная корзина (antiparallel basket) и параллельный пропеллер (parallel propeller), в соотношении 1 : 1 (рис. 14Б,Г). Кроме того, последовательность ТТ(GGGTTA)<sub>3</sub>GGGA, слегка отличающаяся от предыдущей, в растворе в присутствии ионов  $K^+$  складывалась в новую структуру гибрид 3 + 1 (hybrid 3 + 1) (рис. 14В).

Изучено также четырехспиральное сочленение ДНК (или «Holliday junction») и изменение его структуры при взаимодействии с эндонуклеазой I бактериофага T7 [76]. ДНК была сформирована из двух цепей Y (обозначены красным цветом) и Z (обозначены синим цветом), которые формирова-



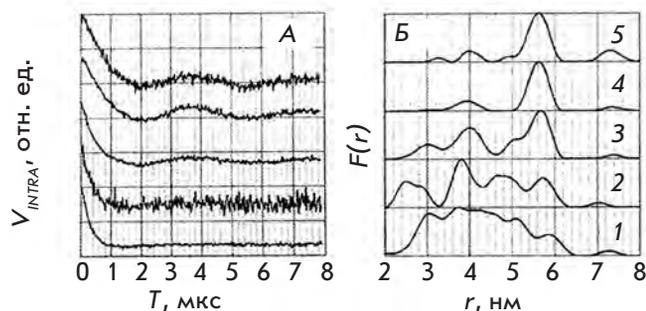
**Рис. 14.** Исследование внутримолекулярной топологии теломерных квадруплексов хромосом человека [74]. А – Структура олигонуклеотида, стрелками отмечены положения спиновых меток. Модели для разных конформеров – antiparallel basket (Б), hybrid 3 + 1 (В), parallel propeller (Г). Черными стрелками показаны расстояния между спиновыми метками. (Воспроизведено с разрешения John Wiley & Sons, Inc.)

ли структуру из четырех спиралей, сочлененных в одном месте:



Метки ТЕМРО были введены по остаткам уридина в разных ветвях дуплекса (метки отмечены жирными буквами **U**). Замороженные буферные растворы содержали  $D_2O$  и дейтероглицерин. Регистрация спадов сигналов PELDOR и их анализ выполнены стандартными методами [21]. Результат действия эндонуклеазы на четырехспиральное сочленение ДНК показан на рис. 15. До введения фермента наблюдалось широкое распределение по расстояниям между метками ТЕМРО в области от 3 до 6 нм, а с увеличением концентрации фермента, по-видимому, вследствие стабилизации комплекса ДНК–фермент, в спектре расстояний наблюдается одна линия с расстоянием между метками в этом комплексе 5.6 нм (рис. 15).

Получены также сведения об изменениях расстояний между метками, введенными в Т7-эндонуклеазу I, при образовании комплекса дуплекс–фермент [76]. Показано, что эти изменения



**Рис. 15.** Зависимость кинетики спада сигнала PELDOR (А) и спектра расстояний (Б) от весового соотношения дуплекс/фермент в замороженном буферном растворе: 1/0.00 (1), 1/0.25 (2), 1/0.50 (3), 1/1.00 (4), 1/1.25 (5) [76]. (Воспроизведено с разрешения American Chemical Society.)

при реорганизации структуры белка невелики (не превышают нескольких Å), но надежно регистрируются методом PELDOR.

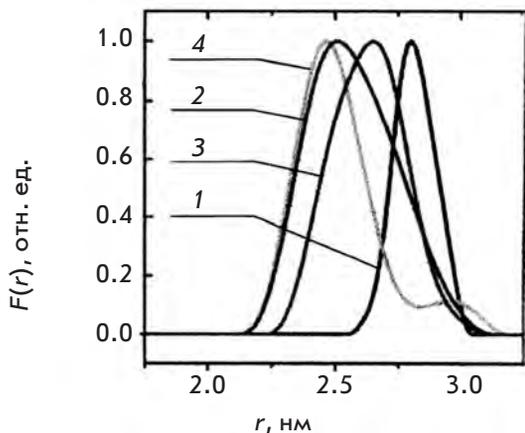
Таким образом, надежно установлено, что при образовании комплекса между Т7-эндонуклеазой I и четырехспиральным ДНК–сочленением происходит индуцированная подгонка конформаций обоих биополимеров. Конформационные изменения, наблюдаемые при образовании комплекса дуплекс–фермент, находят подтверждение при его расчетах методами МД. Отметим высокий экспериментальный уровень (надежность и точность PELDOR-эксперимента и его обработки) работы [76].

### Влияние дефектов на структуру ДНК

В работах [77–79] изучено влияние различных модифицирующих повреждений на изменение структуры ДНК, в частности расстояний между введенными спиновыми метками. Такими повреждениями могут быть различные факторы: структурные агрегаты или группы, связывающие в определенном месте ДНК, замещение нуклеотидов различными структурами, разрыв одной из цепей ДНК в дуплексе и т.п. Все эти факторы, химически модифицирующие ДНК, проявляются в эндогенном метаболизме, их изучение физическими методами представляет большой интерес для биологов и биохимиков.

Изменения расстояний между метками в ДНК–дуплексах, содержащих различные структурные повреждения и вставки в одной из цепей дуплекса, анализировали в работе [77]. Спиновые метки 4-амино-ТЕМРО вводили по остаткам гуанина другой цепи ДНК (см. также ссылку [49]) в положения (4;11) (А) и (4;19) (В), а вторая цепь дуплекса содер-





**Рис. 16.** Функции распределения по расстояниям между спиновыми метками для неповрежденной ДНК с метками 4;11 (1) и ее изменение при введении повреждений типа пропил – (2), этил – (3), ТНФ – (4) (см. табл. 3). Показаны функции, полученные в стандартном эксперименте, с учетом ориентационной селективности [77]. (Воспроизведено с разрешения Oxford University Press.)

между метками в этой группе малы по сравнению с неповрежденной ДНК и в основном лежат в пределах ошибок измерений. Во второй группе, которую образуют дуплексы с повреждениями типа E3, E4, E5, обнаруживается как значительное уменьшение расстояний, так и уширение функции распределения  $F(r)$ , сопровождающееся ее асимметрией. Близкая ситуация наблюдается и в случае дуплексов с метками в положении (4;19), где расстояния меняются от  $5.21 \pm 0.04$  нм для исходной неповрежденной структуры до  $5.02 \pm 0.03$  нм для поврежденных дуплексов типа (5.4), (5.5), а ширина функции распределения при этом меняется от  $0.33 \pm 0.02$  до  $0.44 \pm 0.05$  нм.

При обсуждении результатов предполагается, что ширина спектра распределения по расстояниям, как это обычно принято, характеризует конформационную гибкость дуплексов. Следуя специально выполненным МД-расчетам, авторы [77] считают, что значительное изменение расстояний во второй группе поврежденных дуплексов связано с локальным изменением конформаций в месте повреждения и в комплементарном нуклеотиде дуплекса.

В общем, результаты работы [77], в которой изучали изменения в ДНК при повреждениях, в ряде случаев качественно согласуются с данными, полученными такими методами, как ЯМР. При этом считается, что в случае спин-меченых ДНК применение импульсного метода ЭПР в сочетании с расчетом ме-

**Таблица 4.** Экспериментальные расстояния  $r_{\max}$  между спиновыми метками и ширины линий  $\Delta$  функции  $F(r)$  (нм) в исследованных в [77] дуплексах со спиновыми метками в положениях (4;11)

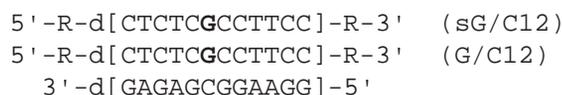
ДНК-дуплекс	$r_{\max}$	$\Delta$
Неповрежденный дуплекс	$2.81 \pm 0.01$	$0.21 \pm 0.02$
Разрыв	$2.87 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.02$
Зазор	$2.84 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.02$
Вставка A <sub>1</sub>	$2.85 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.02$
8-охоG (дуплекс E1)	$2.81 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.02$
8-охоG (дуплекс E2)	$2.84 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.02$
ТНФ	$2.46 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.02$
Этил	$2.65 \pm 0.02$	$0.38 \pm 0.04$
Пропил	$2.48 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.03$

тодами МД является дополнительным (к традиционным ЯМР, КД, FRET и рентгеновской кристаллографии), весьма информативным методом изучения различных повреждений ДНК и ее слабых взаимодействий с другими молекулами и комплексами.

Чувствительность параметров, определяемых методом PELDOR, к структурам нуклеиновых кислот оказалась значительно выше, чем в работе [77], когда спиновые метки вводили в концы достаточно коротких олигонуклеотидов и их дуплексов [78, 79].

Метод 3pPELDOR использован для определения функции парного распределения между метками на концах 12-мерных олигонуклеотидов и их ДНК-дуплексов [78]. Синтезированные субстраты содержали спиновые метки по 5'- и 3'-концевым фосфатным группам.

Структуры одноцепочечных ДНК и ДНК-дуплексов длиной 12 нуклеотидов, а также их обозначения приведены ниже:



Один из нуклеотидов, расположенный в центре цепи **G**, мог быть модифицирован различными вставками и заместителями. Структуры спиновых меток и вводимых вставок приведены в табл. 5.

Для получения функций распределения по расстояниям между метками методом 3pPELDOR исследовали замороженные стеклообразные растворы спин-меченых ДНК в смеси вода/глицерин при 77 К. Функции распределения по расстояниям  $F(r)$  определяли из экспериментальных спадов  $V_{\text{INTRA}}$  методом регуляризации Тихонова как с помощью стандартного алгоритма, так и с использованием гауссовской аппроксимации для  $F(r)$ .

Таблица 5. Структуры радикала R, нуклеотидов и ненуклеотидных вставок [78, 79]

THF	G	deg <sub>2</sub> p	R	8-oxoG

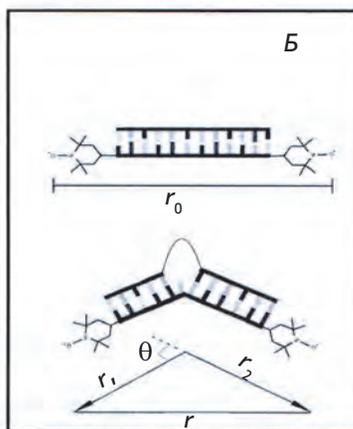
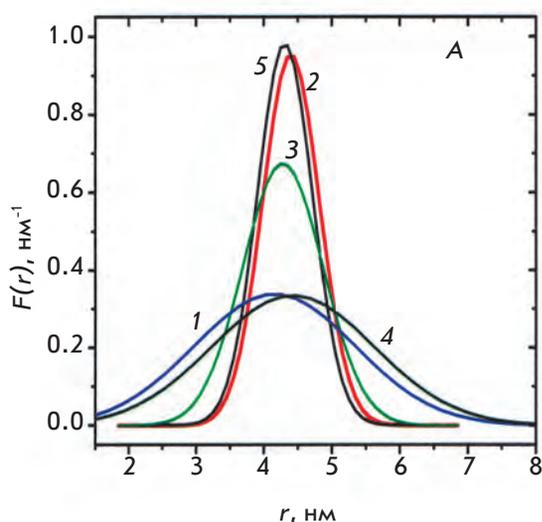


Рис. 17. А – Функция распределения по расстояниям (гауссовское приближение) между спиновыми метками в водно-глицериновых растворах ДНК при 77 К [78]. 1 – одноцепочечная ДНК sG/C12 (синяя линия), 2 – дуплекс G/C12 (красная линия), 3 – дуплекс deg<sub>2</sub>p/C12, 4 – одноцепочечная ДНК THF/C12, 5 – дуплекс THF/C12. Б – Схема, поясняющая определение угла изгиба  $\theta$  для поврежденной ДНК. (Воспроизведено с разрешения The Royal Society of Chemistry.)

Из приведенных на рис. 17А спектров расстояний и данных табл. 6 видно, что при образовании дуплексов происходит сужение функций распределения в 2–3 раза по сравнению с одноцепочечными ДНК. Введение вставок аналогов нуклеотидов приводит к уменьшению среднего расстояния между метками в дуплексах. В случае вставки **deg<sub>2</sub>p** наблюдается заметное уширение спектра расстояний по сравнению с дуплексами **G/C12**.

Очевидно, что сужение функций распределения по расстояниям между метками при образовании дуплексов связано с образованием двойной спирали ДНК, обладающей более жесткой структурой по сравнению с одноцепочечной ДНК. Наблюдаемая ширина спектра неискаженного дуплекса (**G/C12**) обусловлена, по-видимому, хаотической ориентацией

спиновых меток за счет вращения вокруг связей P–N. Учитывая, что расстояние от атома азота до N–O-фрагмента спиновой метки составляет около 0.4 нм, максимальное уширение спектра за счет переориентации спиновых меток будет равно 1.6 нм. В этой области лежит величина экспериментального значения ширины спектра расстояний  $\Delta = 0.98 \pm 0.1$  нм для неповрежденного дуплекса. Отметим, что эффектов, связанных с ориентационной селективностью в PELDOR, в этой работе, как и в [77], не обнаружено, что также связано, по-видимому, с некоррелированным разбросом ориентаций спиновых меток.

Включение ненуклеотидных вставок в структуру дуплекса влияет на среднее расстояние между метками. Уменьшение расстояния указывает на возможность изгиба дуплекса относительно места располо-

**Таблица 6.** Параметры функции распределения (нм) по расстояниям для 12-мерных олигонуклеотидов и их ДНК-дуплексов [78]

Образец*	Среднее расстояние, $r$	Ширина, $\Delta$
sG/C12	$4.05 \pm 0.05$	$2.8 \pm 0.2$
sTHF/C12	$4.32 \pm 0.05$	$2.85 \pm 0.2$
G/C12	$4.35 \pm 0.03$	$0.98 \pm 0.1$
deg <sub>2</sub> p/C12	$4.23 \pm 0.03$	$1.39 \pm 0.1$
THF/C12	$4.26 \pm 0.03$	$0.95 \pm 0.1$

\*Символ s обозначает одноцепочечную ДНК.

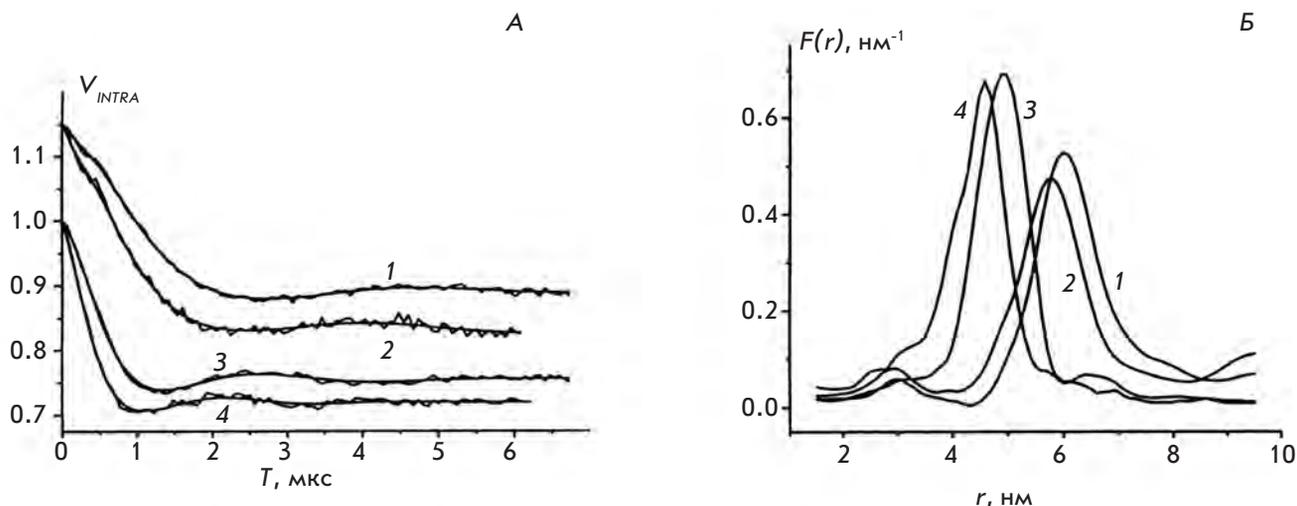
жения вставок за счет появления дополнительной степени свободы в области вставки. Схема, иллюстрирующая расчет угла конформационного искажения, показана на рис. 17Б. Используя экспериментально найденные значения  $r_0$  (дуплекс без вставки) и  $r$  для искаженного дуплекса можно получить приблизительную оценку величины угла  $\theta = 23^\circ$  в дуплексе **THF/C12** и  $\theta = 27^\circ$  в петельном дуплексе **deg<sub>2</sub>p/C12**.

Увеличение длины и гибкости вставки в дуплексе **deg<sub>2</sub>p/C12** по сравнению с двумя другими дуплексами приводит к дополнительному уширению ( $\Delta = 1.39$  нм)

спектра расстояний. Величина уширения слишком велика, чтобы ее можно было объяснить одним только разбросом по углу изгиба дуплекса без учета возможного удлинения дуплекса. По этой причине сделанная выше оценка угла изгиба для этой вставки может служить только нижней границей среднего угла изгиба для данного дуплекса.

Таким образом, приведенные оценки показывают, что введение ненуклеотидных вставок в молекулу ДНК открывает возможность изгиба дуплекса относительно места введения вставки. Увеличение количества связей во вставке повышает гибкость вставки. Уменьшение жесткости дуплекса в районе вставки приводит к значительному увеличению разброса угла изгиба и общей длины дуплекса.

В работе [79] для исследования повреждений в протяженных ДНК-дуплексах (13 и 17 нуклеотидов) использовали тот же подход, что и в [78]. Однако основной целью этой работы стало изучение особенностей конформационных превращений ДНК при взаимодействии с Fpg-белком *E. coli*, одним из ключевых ферментов, вовлеченных в процессы репарации ДНК. Структура изученных дуплексов показана ниже:



**Рис. 18.** Данные PELDOR для комплексов ДНК с ферментом Fpg [79]. А – Спады сигналов PELDOR,  $V_{INTRA}(T)$  для **G/C17** (кривая 1), **THF/C17/Fpg** (2), **G/C13** (3), **THF/C13/Fpg** (4). Для удобства кривые 1 и 2 сдвинуты относительно 3 и 4. Сплошные кривые – расчет с использованием функций  $F(r)$ , приведенных в части Б. Б – Функции распределения по расстояниям между метками, полученные из данных части А без учета ориентационной селективности. Кривые 1 и 2 относятся к ДНК **G/C17** и **THF/C17/Fpg**, кривые 3 и 4 относятся к ДНК **G/C13** и **THF/C13/Fpg**. (Воспроизведено с разрешения Royal Society of Chemistry.)

**Таблица 7.** Параметры (нм) функций распределения по расстояниям  $F(r)$  между двумя спиновыми метками в дуплексах ДНК [79]

Образец	$r_{\max}$ , нм*	$\Delta$ , нм*
G/C13	4.96	1.1
8-охоG/C13	4.96	1.1
ТНФ/C13	4.83	1.1
ТНФ/C13/Fpg	4.60	1.2
G/C13/Fpg	4.78	1.1
G/C17	6.00	1.2
8-охоG/C17	6.02	1.2
ТНФ/C17	5.98	1.2
ТНФ/C17/Fpg	5.76	1.2
G/C17/Fpg	5.99	1.4

\*Ошибки в измерениях  $r_{\max}$  и  $\Delta$  составляют 0.8 и 10% соответственно.

Строение спиновых меток R, нуклеотидов и ненуклеотидных вставок приведено в табл. 5.

Анализ спадов сигналов PELDOR (рис. 18А) позволил получить функции распределения по расстояниям  $F(r)$  (рис. 18Б) и определить структурные параметры – значения расстояний в максимуме функции распределения,  $r_{\max}$  (точность 0.8%), и ширину функции на полувысоте  $\Delta$  (точность 10%) (табл. 7).

Как и в работе [78], положение спиновых меток по 5'- и 3'-концам комплементарного второго олигонуклеотида ДНК-дуплекса делало их чувствительными к возникновению изгибов в ДНК, вызванных либо наличием поврежденных сайтов, либо образованием комплексов с ферментом. Обнаружено, что Fpg-белок из *E. coli* вызывает изгибание даже неповрежденного 13-звенного дуплекса. Аналогичный результат ранее получили лишь при помощи рентгеноструктурного анализа и Fpg из *Bacillus stearothermophilus* [80–82]. Однако в случае неповрежденного 17-звенного дуплекса не обнаружили образования изгиба в присутствии фермента. Вероятно, это связано с тем, что фермент, который занимает на ДНК участок размером 10 нуклеотидов, не может передвигаться (скользить) вдоль цепи короткого ДНК-дуплекса, тогда как при связывании с 17-звенным ДНК-дуплексом такая возможность имеется. Не исключено, однако, что конформационная подвижность спиновых меток

17-звенного дуплекса выше, чем 13-звенного, о чем свидетельствует увеличение ширины функции  $F(r)$  для 17-звенного дуплекса (см. табл. 7).

В свободных ДНК-дуплексах, содержащих 8-охоG, не отмечено изменений расстояния между метками по сравнению с неповрежденным дуплексом. Это не удивительно, поскольку 8-охоG практически не изменяет структуру ДНК. В случае дуплексов, содержащих циклический ТНФ-сайт, наблюдалось заметное уменьшение расстояния между метками. Этот результат подтвержден также путем компьютерного моделирования методом молекулярной динамики [79].

При взаимодействии дуплексов с Fpg-белком *E. coli* изгибы возникали и в 13-, и в 17-звенных дуплексах. Этот результат согласуется с данными, полученными методом РСА для «сшитого» аддукта Fpg с апури/апиридинового сайтом [80–82]. Важно отметить, что данные РСА дают информацию о локальных участках ДНК в области повреждения, тогда как PELDOR – о глобальных изменениях структуры. Таким образом, структурные исследования обоих типов согласуются между собой и дополняют друг друга.

Зарегистрированные методом PELDOR [78, 79] изгибы ДНК-спирали в области поврежденного нуклеотида дают новую информацию о механизме поиска повреждений в ДНК ферментами репарации. Появление изгибов позволяет понять, почему ферменты, которые скользят вдоль цепи ДНК, останавливаются на поврежденных сайтах и осуществляют их репарацию. Полученные данные также важны для выяснения механизмов действия других ферментов, осуществляющих поиск специфических сайтов в ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подведем некоторые итоги изучения ДНК и РНК методом PELDOR. Показано, что в результате измерения расстояний между различными фрагментами поли- и олигонуклеотидов методом PELDOR можно определить конформации ДНК и РНК, изменение конформаций в результате структурных модификаций и превращений, оценить разброс в расстояниях между отдельными группами, жесткость структуры, определить ориентации спиновых меток, введенных в ДНК и РНК. Начаты исследования влияния среды и образования комплексов с белками на структурные параметры ДНК и РНК.

Рассмотренные в обзоре работы показывают особенности, преимущества и недостатки метода PELDOR по сравнению с аналогичными структурными методами. Из очевидных, наиболее существенных преимуществ отметим достаточно широкий диапазон измеряемых с высокой точностью расстояний меж-

ду спиновыми метками (1.5–8 нм), причем, что выделяет PELDOR из других структурных методов, определяются не только расстояния, но и функция распределения по расстояниям. Разработаны достаточно простые способы анализа данных экспериментов, проводимых в хаотически ориентированных системах, в смесях и растворах, удобных для химиков и биологов. Импульсные ЭПР-спектрометры коммерчески доступны. Все это определило популярность PELDOR в современной химической радиоспектроскопии, особенно в случае биологически важных систем.

В то же время, на наш взгляд, к недостаткам метода, по сравнению, например, с методом ЯМР, следует отнести необходимость введения спиновых меток в исследуемую молекулу. Однако направленное введение спиновых меток, несмотря на успешную разработку ряда химических методов, операция все еще достаточно трудоемкая. Кроме того, необходимо убедиться, что спин-меченая молекула не потеряла своих исходных физико-химических и биологических свойств. Из-за эффектов линкера «молекула-метка» измеренное расстояние между метками может не совпадать с молекулярным расстоянием. Как правило, все эти проблемы стоят и решаются в том или ином виде в большинстве рассмотренных выше работ. Необходимо также выбирать специальный растворитель, который должен стекловаться при замораживании, так как все измерения выполняются в стеклообразных матрицах при низких температурах. Отметим, что эти же недостатки присущи и измерениям расстояний по дипольному уширению линий в спектре стационарного ЭПР, ограниченного расстояниями, меньшими 2–2.5 нм [29].

По методической постановке PELDOR близок к широко применяемому методу FRET [83], при помощи которого исследуется передача возбуждения между введенными метками донора и акцептора. Отметим, что две флуоресцентные метки, которые вводятся для FRET-измерений, отличаются по строению (а не одинаковые, как в PELDOR) и, как правило, достаточно объемные по сравнению со спиновыми метками. Эффективность FRET пропорциональна величине  $1/[1 + (r/R_0)^6]$ , где  $R_0$  – радиус Фёрстера,  $r$  – расстояние между метками [84]. Радиус Фёрстера

зависит от ряда таких параметров, как интеграл перекрытия спектров донора и акцептора, квантового выхода флуоресценции, ориентации электрических диполей. Это требует, в отличие от PELDOR, проведения дополнительных экспериментов или калибровок для определения расстояния между метками, что снижает точность определения этих расстояний. Главное преимущество FRET – его предельно высокая чувствительность. Как и во многих современных оптических методах, с его помощью возможны измерения до единичных молекул, в том числе быстропротекающих превращений в жидкостях. Предельная чувствительность PELDOR составляет около  $10^{12}$  частиц в образце [10].

Таким образом, выбор метода исследования структуры и свойств поли- и олигонуклеотидов определяется, прежде всего, постановкой задачи и возможностями эксперимента. В идеале сочетание PELDOR и FRET дают наиболее полную информацию о строении и физико-химических свойствах биологически важных структур. Такие работы уже проводятся. Например, имеются публикации, в которых метод применяли для изучения особенностей строения белково-нуклеиновых комплексов [85, 86]. Среди них достаточно сложный надмолекулярный комплекс, моделирующий строение гистонов хроматина [87].

Полученная с помощью метода PELDOR информация вносит, на наш взгляд, существенный вклад в изучение строения и свойств ДНК и РНК. Открываются перспективы для исследований сложных нелинейных структур, взаимодействий полинуклеотидов с ферментами, белками, мембранами. Несомненно, что возможности PELDOR как структурного исследовательского метода будут возрастать с развитием техники импульсной ЭПР-спектроскопии. ●

*Авторы благодарны О.В. Полукариковой за помощь при подготовке обзора.*

*Работа поддержана РФФИ (гранты № 10-04-00070а, 11-03-0011а и 11-04-01377а), НШ-64.2012.04, Отделением химии и наук о материалах РАН (проект 5.6.3, грант 5.6), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры» (государственные контракты № 8092, 8473).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милов А.Д., Салихов К.М., Щиров М.Д. // Физика твердого тела. 1981. Т. 23. С. 975–982.
2. Schiemann O., Prisner T.F. // Quart. Rev. Biophys. 2007. V. 40. P. 1–53.
3. Jeschke G., Polyhach Ye. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2007. V. 9. P. 1895–1910.
4. Цветков Ю.Д., Милов А.Д., Марьясов А.Г. // Успехи химии. 2008. Т. 6. С. 515–551.
5. Sowa Z., Qin P.Z. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 2008. V. 82. P. 147–197.
6. Schiemann O. // Meth. Enzymol. 2009. V. 469. Ch. 16. P. 329–351.
7. Reginsson G.W., Schiemann O. // Biochem. Soc. Trans. 2011. V. 39. P. 128–139.

8. Reginsson G.W., Schiemann O. // *Biochem. J.* 2011. V. 434. P. 353–363.
9. Milov A.D., Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D. // *Appl. Magn. Reson.* 1998. V. 15. P. 107–143.
10. Цветков Ю.Д., Гришин Ю.А. // *Приборы и техника эксперимента.* 2009. № 5. С. 5–28.
11. Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D. // *Appl. Magn. Reson.* 2000. V. 18. P. 583–605.
12. Ponomarev A.B., Milov A.D., Tsvetkov Yu.D. // *J. Struct. Chem. (Russ.)*. 1984. V. 25. P. 51–54.
13. Milov A.D., Ponomarev A.V., Tsvetkov Yu.D. // *Chem. Phys. Lett.* 1984. V. 110. P. 67–72.
14. Milov A.D., Samoilova R.I., Tsvetkov Yu.D., Jost M., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Handgraaf J.-W., Raap J. // *Chem. Biodiv.* 2007. V. 4. P. 1275–1298.
15. Tikhonov A.N., Arsenin V.Y. *Solutions of ill-posed problems.* N.Y.: Wiley, 1977.
16. Bowman K., Maryasov A.G., Kim N., DeRose V.J. // *Appl. Magn. Reson.* 2004. V. 26. P. 23–39.
17. Jeschke G., Koch A., Jonas U., Godt A. // *J. Magn. Reson.* 2002. V. 155. P. 72–82.
18. Jeschke G., Panek G., Godt A., Bender A., Paulsen H. // *Appl. Magn. Reson.* 2004. V. 26. P. 223–244.
19. Chiang Y.-W., Borbat P.P., Freed J.H. // *J. Magn. Reson.* 2005. V. 172. P. 279–295.
20. Jeschke G., Sajid M., Schulte M., Godt A. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. V. 11. P. 6580–6592.
21. Jeschke G., Chechik V., Ionita P., Godt A., Zimmermann H., Bbanham J., Timmel C.R., Hilger D., Jung H. // *Appl. Magn. Reson.* 2006. V. 30. P. 473–498.
22. Milov A.D., Samoilova R.I., Tsvetkov Yu.D., Gusev V.A., Formaggio F., Grisma M., Toniolo C., Raap J. // *Appl. Magn. Reson.* 2002. V. 23. P. 81–95.
23. Milov A.D., Tsvetkov Yu.D., Formaggio F., Oancea S., Toniolo C., Raap J. // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V. 107. P. 13719–13727.
24. Tsvetkov Yu.D. / *Biological Magnetic Resonance (EPR: Instrumental Methods)* // Eds C.J. Bender, L.J. Berliner. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. V. 21. P. 385.
25. Savitsky A., Dubinskii A.A., Flores M., Lubitz W., Möbius K. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 6245–6262.
26. Marko A., Margraf D., Yu H., Mu Y., Stock G., Prisner T. // *J. Chem. Phys.* 2009. V. 130. 064102.
27. Marko A., Margraf D., Cekan P., Sigurdsson S.T., Schiemann O., Prisner T.F. // *Phys. Rev. E.* 2010. V. 81. 021911.
28. *Biological Magnetic Resonance. Spin Labeling: The Next Millennium* / Ed. L. Berliner. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998. V. 14.
29. *Biological Magnetic Resonance. Distance Measurements in Biological Systems by ESR* / Eds L. Berliner, S. Eaton, G. Eaton. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000. V. 19.
30. *Biological Magnetic Resonance. EPR: Instrumental Methods* / Eds C. Bender, L. Berliner. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. V. 21.
31. Schiemann O., Piton N., Plackmeyer J., Bode B.E., Prisner T.F., Engels J.W. // *Nat. Protocols.* 2007. V. 2. P. 904–923.
32. Krstić I., Endeward B., Margraf D., Marko A., Prisner T.F. // *Top. Curr. Chem.* 2012. V. 321. P. 159–198.
33. Shelke S.A., Sigurdsson S.T. // *Eur. J. Org. Chem.* 2012. P. 2291–2301.
34. Spaltenstein A., Robinson B., Hopkins P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. V. 110. P. 1299–1301.
35. Rossi R., Carpita A., Bellina F. // *Org. Prep. Proc. Int.* 1995. V. 27. P. 127–160.
36. Chinchilla R., Nájera C. // *Chem. Rev.* 2007. V. 107. P. 874–922.
37. Gannett P.M., Darian E., Powell J.H., Johnson E.M. // *Synthetic Communications.* 2001. V. 31. P. 2137–2141.
38. Gannett P.M., Darian E., Powell J., Johnson E.M. II, Mundoma C., Greenbaum N.L., Ramsey C.M., Dalal N.S., Budil D.E. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 5328–5337.
39. Frolow O., Bode B.E., Engels J.W. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2007. V. 26. P. 655–659.
40. Piton N., Schiemann O., Mu Y., Stock G., Prisner T.F., Engels J.W. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2005. V. 24. P. 771–775.
41. Piton N., Mu Y., Stock G., Prisner T.F., Schiemann O., Engels J.W. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3128–3143.
42. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. V. 40. P. 2004–2021.
43. Ding P., Wunnicke D., Steinhoff H.-J., Seela F. // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. P. 14385–14396.
44. Jakobsen U., Shelke S.A., Vogel S., Sigurdsson S.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 10424–10428.
45. Schiemann O., Weber A., Edwards T.E., Prisner T.F., Sigurdsson S.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 3434–3435.
46. Schiemann O., Piton N., Mu Y., Stock G., Engels J.W., Prisner T.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 5722–5729.
47. Cai Q., Kusnetzow A.K., Hubbell W.L., Haworth I.S., Gacho G.C., Eps N.V., Hideg K., Chambers E.J., Qin P.Z. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4722–4730.
48. Cai Q., Kusnetzow A.K., Hideg K., Price E.A., Haworth I.S., Qin P.Z. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 2110–2117.
49. Sicoli G., Mathis G., Delalande O., Boulard Y., Gasparutto D., Gambarelli S. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 735–737.
50. Yu H., Mu Y., Nordenskiöld L., Stock G. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. P. 1781–1787.
51. Romainczyk O., Endeward B., Prisner T.F., Engels J.W. // *Mol. BioSystems.* 2011. V. 7. P. 1050–1052.
52. Ward R., Keeble D.J., El-Mkami H., Norman D.G. // *ChemBioChem.* 2007. V. 8. P. 1957–1964.
53. Wunnicke D., Ding P., Seela F., Steinhoff H.-J. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. V. 116. P. 4118–4123.
54. Flaender M., Sicoli G., Aci-Seche S., Reignier T., Maurel V., Saint-Pierre C., Boulard Y., Gambarelli S., Gasparutto D. // *ChemBioChem.* 2011. V. 12. P. 2560–2563.
55. Takeuchi M., Lillis R., Demple B., Takeshita M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 21907–21914.
56. Schiemann O., Cekan P., Margraf D., Prisner T.F., Sigurdsson S.Th. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 3292–3595.
57. Barhate N., Cekan P., Massey A.P., Sigurdsson S.Th. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007. V. 119. P. 2655–2658.
58. Hagerman P.J. // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1988. V. 17. P. 265–286.
59. Gore J., Bryant Z., Nöllmann M., Le M.U., Cozzarelli N.R., Bustamante C. // *Nature.* 2006. V. 442. P. 836–839.
60. Marko J.F. // *Europhys. Lett.* 1997. V. 38. P. 183–188.
61. Mathew-Fenn R.S., Das R., Harbury P.A. // *Science.* 2008. V. 322. P. 446–449.
62. Marko A., Denysenkov V., Margraf D., Cekan P., Schiemann O., Sigurdsson S.Th., Prisner T.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 13375–13379.
63. Raitsimring A.M., Gunanathan C., Potapov A., Efemenko I., Martin J.M.L., Milstein D., Goldfarb D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 14138–14139.
64. Potapov A., Song Y., Meade T.J., Goldfarb D., Astashkin A.V., Raitsimring A. // *J. Magn. Res.* 2010. V. 205. P. 38–49.
65. Song Y., Meade T.J., Astashkin A.V., Klein E.L., Enemark J.H., Raitsimring A. // *J. Magn. Res.* 2011. V. 210. P. 59–68.
66. Yang Z., Kise D., Saxena S. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114.

- P. 6165–6174.
67. Sicoli G., Wachowius F., Bennati M., Höbartner C. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. V. 49. P. 6443–6447.
68. Krstić I., Frolov O., Sezer D., Endeward B., Weigand J.E., Suess B., Engels J.W., Prisner T.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 1454–1455.
69. Wunnicke D., Strohbach D., Weigand J.E., Appel B., Feresin E., Suess B., Müller S., Steinhoff H.-J. // *RNA*. 2011. V. 17. P. 182–188.
70. Krstić I., Hänsel R., Romainczyk O., Engels J.W., Dötsch V., Prisner T.F. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. V. 50. P. 5070–5074.
71. Azarkh M., Okle O., Singh V., Seemann I.T., Hartig J.S., Dietrich D.R., Drescher M. // *ChemBioChem*. 2011. V. 12. P. 1992–1995.
72. Kim N.-K., Bowman M.K., DeRose V.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 8882–8884.
73. Zhang X., Tung C.-S., Sowa G.Z., Hatmal M.M., Haworth I.S., Qin P.Z. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 2644–2652.
74. Singh V., Azarkh M., Exner T.E., Hartig J.S., Drescher M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 9728–9730.
75. Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E., Levene S.D., Shay J.W. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 2801–2809.
76. Freeman A.D.J., Ward R., Mkami H.E., Lilley D.M.J., Norman D.G. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. P. 9963–9972.
77. Sicoli G., Mathis G., Aci-Seche S., Saint-Pierre C., Boulard Y., Gasparutto D., Gambarelli S. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 3165–3176.
78. Kuznetsov N.A., Milov A.D., Koval V.V., Samoilova R.I., Grishin Yu.A., Knorre D.G., Tsvetkov Yu.D., Fedorova O.S., Dzuba S.A. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. V. 11. P. 6826–6832.
79. Kuznetsov N.A., Milov A.D., Isaev N.P., Vorobjev Yu.N., Koval V.V., Dzuba S.A., Fedorova O.S., Tsvetkov Yu.D. // *Mol. BioSystems*. 2011. V. 7. P. 2670–2680.
80. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. // *Science*. 2006. V. 311. P. 1153–1157.
81. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Karplus M., Verdine G.L. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 1468–1478.
82. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 19811–19816.
83. Lacowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
84. Förster T. // *Ann. Physik*. 1948. V. 437. P. 55–74.
85. Grohmann D., Klose D., Klare J.P., Kay C.W.M., Steinhoff H.-J., Werner F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 5954–5955.
86. Sarver J. L., Townsend J. E., Rajapakse G., Jen-Jacobson L., Saxena S. // *J. Phys. Chem. B*. 2012. V. 116. P. 4024–4033.
87. Ward R., Bowman A., El-Mkami H., Owen-Hughes T., Norman D.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 1348–1349.

УДК 577.2

# Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы

О. Г. Максименко<sup>1</sup>, А. В. Дейкин<sup>1</sup>, Ю. М. Ходарович<sup>2</sup>, П. Г. Георгиев<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: georgiev\_p@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2012

**РЕФЕРАТ** В течение последних 20 лет предпринимались многочисленные попытки использования животных для производства рекомбинантных белков человека и моноклональных антител. Однако только недавно на рынке появились два первых терапевтических препарата, полученных из молока трансгенных животных: С1-ингибитор (Ruconest) и антитромбин (ATryn). Это позволяет надеяться на доведение в ближайшем времени до практического применения большего числа новых рекомбинантных белков, созданных с помощью этой технологии. В настоящем обзоре описаны способы получения трансгенных животных, обсуждаются преимущества и недостатки их использования для производства рекомбинантных белков человека и моноклональных антител.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биореактор, продукция белков в молоке, производство моноклональных антител, рекомбинантные белки, терапевтические препараты, трансгенные животные.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** мАТ – моноклональные антитела; МИ – микроинъекция ДНК в ядро; ПЯ – перенос ядер; РБ – рекомбинантный белок; рЧАБ – рекомбинантный альбумин человека; рЧБХЭ – рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека; ТЖ – трансгенное животное; FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (США); ЕМЕА – Европейское агентство по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов; СНО – культура клеток яичников китайского хомячка; ES-клетки – эмбриональные стволовые клетки; НТО – нетранслируемая область гена.

## ВВЕДЕНИЕ

После успешной экспрессии первых рекомбинантных белков (РБ) в бактериях и дрожжах стало понятно, что в данных системах нельзя эффективно производить многие РБ человека. Так, в клетках бактерий белки человека не подвергаются посттрансляционным модификациям, а характер модификаций в клетках дрожжей отличается от модификаций в клетках человека. Кроме того, в данных экспрессионных системах не происходит правильный фолдинг многих сложных РБ человека [1, 2]. Поэтому встал вопрос о необходимости развития альтернативных систем экспрессии, способных обеспечить правильные посттрансляционные модификации РБ. В результате началась параллельная разработка двух технологических платформ – на основе трансгенных животных и в культурах клеток млекопитающих.

Первый успешный опыт получения трансгенных млекопитающих в результате микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеус зиготы мыши был осуществлен более 20 лет назад [3].

С тех пор в научных целях, для улучшения пород животных и продукции РБ получено большое количество трансгенных животных (ТЖ) [4–9]. В конце прошлого века сложилось представление, согласно которому ТЖ считали наиболее перспективной платформой для производства РБ человека и моноклональных антител (мАТ). Однако, несмотря на это, доминирующую роль в производстве РБ заняли культуры клеток млекопитающих и, в первую очередь, клетки яичников китайского хомячка (СНО). Так, к 2012 году на рынке США было представлено 312 терапевтических препаратов, полученных с помощью живых организмов [10]. С использованием культур клеток млекопитающих получено 193 продукта, из них 42 – в культуре клеток СНО. Во многом это обусловлено тем, что только в 2006 году Европейским агентством лекарственных средств (ЕМЕА) был одобрен антитромбин – первый рекомбинантный белок, выделенный из молока трансгенных коз [11]. Этот белок в дальнейшем разрешили для коммерциализации Управлением по контролю качества



Рис. 1. Схема получения трансгенных животных методом переноса ядер (верхняя часть) и микроинъекции ДНК в ядро (нижняя часть)

пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) в качестве препарата для предотвращения образования тромбов у пациентов с наследственным дефицитом антитромбина. В 2011 году ЕМЕА одобрило применение рекомбинантного С1-ингибитора эстеразы, произведенного в кроликах, при наследственном ангионевротическом отеке. Появление первых допущенных к медицинскому применению терапевтических препаратов, полученных с использованием ТЖ, дает основания предполагать, что в ближайшее время РБ займут значительную нишу в биотехнологии. Некоторые биотехнологические компании (PPL Therapeutics (Англия), GTC Biotherapeutics (США) (поглощена в 2010 году компанией LFB Biotechnologies, Франция), Nematech (США), Genzyme (США), ZymoGenetics (США), Nexia Biotechnologies (Канада), Pharming (Нидерланды), BioProtein Technologies (Франция), Avigenics (США), Viragen (США) и TranXenoGen (США)) активно работают над развитием этой технологии. В настоящем обзоре приведены общие представления о получении ТЖ для продукции РБ человека и мАТ.

### ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

К методам, позволяющим получать сельскохозяйственных животных-продуцентов, содержащих трансген во всех клетках и передающих его потомкам, сегодня можно отнести микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот (МИ) и перенос ядер соматических клеток (ПЯ). Наибольшее распространение получил метод микроинъекции ДНК в мужской пронуклеус зигот [12] (рис. 1). Линейная ДНК при по-

падании в ядро способна встраиваться в геном клеточных линий или живых организмов [13]. Обычно ДНК встраивается в транскрипционно неактивные, бедные генами, районы и в гетерохроматин. В один геномный сайт может попасть от одной до нескольких десятков и даже сотен копий инъецированной конструкции. Впервые эту технологию опробовали на мышах, и до сих пор она остается надежным способом получения ТЖ. С использованием данного способа получили также первых сельскохозяйственных ТЖ. Однако в настоящее время методом МИ получают в основном трансгенных мышей, кроликов и свиней. Это связано с недостаточной эффективностью метода, обусловленной низкой частотой встраивания рекомбинантной ДНК в геном, доступностью зигот на стадии двух пронуклеусов; результат зависит от проведения большого числа хирургических операций, а значит, содержания значительного (200–300 голов) экспериментального стада и квалифицированной работы с животными. Кроме того, единственный способ определения уровня экспрессии встроившегося трансгена – исследование первичных ТЖ и их потомков. Репродуктивный цикл у крупных животных (с учетом времени достижения физиологической зрелости и необходимости получить от первичных трансгенных самок самок-продуцентов РБ с молоком) составляет примерно 0.9/2.3 года у самок/самцов коз, 1.0/2.3 года – у свиней, 2.3/4.5 года – у коров. Эти ограничения увеличивают себестоимость получения первичных ТЖ и время, требуемое для организации такой работы.

В 1997 году путем переноса ядра (ПЯ) соматической клетки молочной железы в ооцит был получен

клон овцы [14]. Это достижение открыло возможности удешевления и упрощения процедуры получения сельскохозяйственных ТЖ (рис. 1), поскольку большая часть работы в этом случае переносится с фермы в лабораторию, где проводят трансфекцию соматических клеток и отбирают клоны, в которых произошла интеграция трансгена в геном. Затем ядро соматической клетки инъецируется в энуклеированный ооцит, который трансплантируют самкам-реципиентам. Обычно для ПЯ используются клетки фибробластов. Большая часть крупных сельскохозяйственных животных в последнее время была получена методом ПЯ [12]. Однако в данном случае трансфицированные клетки отбирают с помощью маркерных генов устойчивости к антибиотикам, что усложняет сертификацию полученных рекомбинантных белков в FDA и EMEA [15]. Для увеличения эффективности такого отбора в качестве дополнительного селекционного агента часто используют флуоресцентные белки, например усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) [16]. Параллельно для удаления селекционных маркеров из генома отобранных клеточных линий применяют, в частности, системы на основе сайт-специфичных рекомбиназ [17].

К негативным последствиям ПЯ-метода относятся низкая выживаемость эмбрионов в ходе внутриутробного развития и слабое здоровье родившихся животных [12]. Это объясняется в том числе неполным репрограммированием соматического ядра, в результате чего нарушается экспрессия ряда генов, необходимых для правильного протекания эмбриогенеза. Кроме того, процесс получения полноценных яйцеклеток и их активация также требуют значительных временных и материальных затрат. В результате, один из мировых лидеров в использовании ПЯ для получения сельскохозяйственных ТЖ, компания «AgroResearch» (Новая Зеландия) отказалась от этого метода. В настоящее время компания разрабатывает альтернативные способы получения сельскохозяйственных ТЖ.

Альтернативой методам МИ и ПЯ могла бы стать технология сайт-специфического трансгенеза с использованием эмбриональных стволовых (ES) клеток [18]. В этом методе трансген встраивают в геном ES-клеток, отбирают клоны с правильной интеграцией нужного числа копий, затем трансгенные ES-клетки вводят в полость бластоцисты, которая трансплантируется самке-реципиенту. После трансплантации таких клеток в яичники взрослых мышей до 30% родившихся мышат могут содержать трансген. Все операции с животными могут проводиться нехирургическими методами, которые широко применяются в животноводстве; для получения трансгенов требуется относительно мало бластоцист, а значит, и не-

большое экспериментальное стадо. Однако этот метод отработан только на мышах и крысах, а линии ES-клеток для сельскохозяйственных животных пока не получены. Сходный подход заключается в трансформации стволовых клеток – предшественников сперматозоидов, и их последующей трансплантации в семенные каналы нефертильных самцов [19].

Другие способы получения ТЖ применяются в настоящее время сравнительно редко. Так, ТЖ можно достаточно эффективно получать, используя ретровирусы, содержащие трансген [12]. Для этого зиготы, лишенные защитной оболочки, культивируют в среде с добавленными лентивирусными частицами, после чего трансплантируют приемным самкам. В зависимости от титра лентивируса происходит интеграция от одной до нескольких копий трансгена, при этом трансгенными могут быть почти 100% потомства [12]. К преимуществам данного метода относится эффективное получение ТЖ любых видов, а также и возможность получить ТЖ только с одной копией трансгена, что иногда бывает необходимо для научных целей. К основным недостаткам метода можно отнести невозможность использования интронов в составе генной конструкции и ограничение максимальной длины трансгена (примерно до 8000 п.н.), что определяется размером вирусной частицы. В результате с помощью этого метода очень трудно добиться высокого уровня экспрессии трансгена.

Перспективным способом получения ТЖ является использование векторов на основе мобильных генетических элементов, которые встраиваются в геном с помощью транспозазы [12]. В зиготу коинъецируют ген, кодирующий транспозазу, и трансген, фланкированный концевыми повторами транспозона. В результате реакции, катализируемой транспозазой, одиночная копия трансгена встраивается в одно или несколько мест в геноме животного. Этот подход уже использовался для получения крупных сельскохозяйственных животных, например свиней [20]. Эффективность интеграции трансгена в этом случае зависит от типа транспозона, длины трансгена, концентрации и места инъекции ДНК и достигает 50% [20]. Однако пока отсутствуют данные об уровнях экспрессии целевого гена в ТЖ, полученных таким способом.

Отдельно следует упомянуть группу методов, основанных на заражении органа или ткани организма дефектным по репликации аденовирусом, содержащим ген целевого белка, что приводит к непродолжительной и не передающейся по наследству продукции РБ в этом органе или ткани.

В настоящее время трудно сравнивать эффективность новых и традиционных методов получения ТЖ.

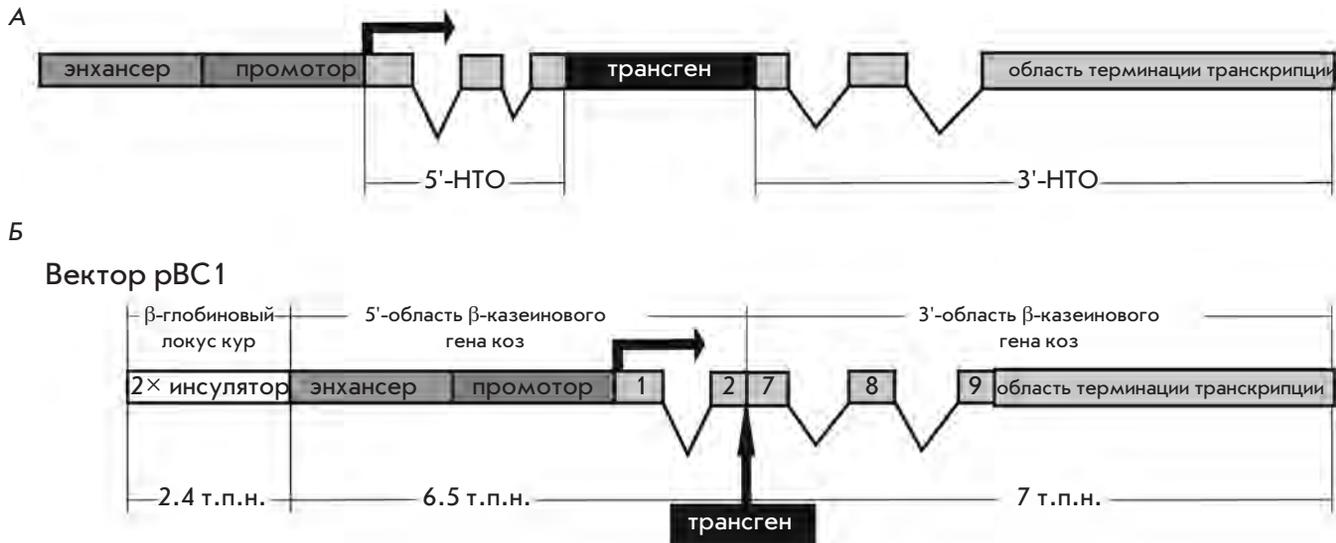


Рис. 2. Векторы для продукции рекомбинантных белков. А – Структура вектора для продукции рекомбинантных белков в трансгенных животных и клеточных линиях. Б – Строение вектора рBC1, используемого для продукции рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных

**ЭКСПРЕССИОННЫЕ ВЕКТОРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

В экспрессионных векторах, обеспечивающих продукцию РБ в молоке, используют регуляторные области генов, белковые продукты которых составляют мажорную фракцию молока. Наиболее популярны регуляторные области гена лактоглобулина овцы, гена кислых белков молочной сыворотки грызунов (мышь, крыса) и кролика, генов α-лактальбумина и α-S1-казеина коровы и гена β-казеина козы [5]. Обычно в экспрессионный вектор включают протяженную 5'-область (1–7 т.п.н.), которая состоит из промотора, тканеспецифичных энхансеров, усиливающих экспрессию в молочной железе, первых некодирующих экзонов и расположенных между ними интронов (рис. 2А). В первых интронах генов с высокой долей вероятности могут находиться регуляторные элементы, способные усиливать транскрипцию гена. В экспрессионный вектор также включают 3'-нетранслируемую область (НТО) гена, размеры которой могут варьировать от 0.5 до 10 т.п.н. и более. Обычно в состав 3'-НТО включают последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательности, которые потенциально могут усиливать терминацию транскрипции. В векторной конструкции 5'- и 3'-НТО могут принадлежать как одному, так и разным генам.

Среди промоторов, используемых для экспрессии в молочных железах, одним из наиболее эффективных для продукции целевых белков в молочных

железах мышей, коз и коров считается промотор гена β-казеина (табл. 1). На основе этого промотора создан самый популярный коммерческий вектор для продукции РБ в молоке ТЖ – рBC1 (Invitrogen) (рис. 2Б). С использованием этого вектора получено большинство трансгенных линий коз с высоким уровнем продукции целевого белка. В этом векторе используется регуляторная область гена β-казеина размером 6.2 т.п.н., состоящая из промотора и гормон-зависимого энхансера, который стимулирует промотор только в клетках молочной железы [31]. В состав вектора также входят 7.8 т.п.н. 3'-области гена β-казеина, которая обеспечивает эффективную терминацию транскрипции, что необходимо как для образования стабильной мРНК, кодирующей целевой белок, так и для предотвращения транскрипции прилежащих геномных районов, способной вызывать формирование репрессированного хроматина по механизму РНК-интерференции. Для накопления целевого белка в молоке кодирующая часть гена должна содержать последовательность сигнального пептида, необходимого для секреции. Такую последовательность можно взять из любого гена, кодирующего секретлируемый белок.

В зависимости от поставленных задач в вектор встраивают либо полный ген с интронами, либо его кДНК, либо мини-ген, содержащий только часть интронов. Как правило, использование гена с неизменной экзон-интронной структурой позволяет получить в ТЖ намного более высокие уровни про-

**Таблица 1.** Сравнение уровня продукции рекомбинантных белков (РБ) молока человека в трансгенных животных (ТЖ) с использованием различных вариантов генной конструкции

РБ/конструкция	Регуляторные элементы	ТЖ/способ получения	Максимальный уровень продукции РБ, мг/мл	Ссылка
<b>Лактоферрин</b>				
Нативный ген	Бакмида	Корова/ПЯ	3.4	[16]
Нативный ген	WAP-ген (21 т.п.н.) (мышь)	Мышь/МИ	30	[21]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Мышь/МИ	160	[22]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/МИ	10.8	[22]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый промотор (корова)	Корова/МИ	3	[23]
кДНК	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/МИ	0.7	[24]
кДНК	$\alpha$ S1-казеиновый промотор (корова)	Мышь/МИ	0.036	[25]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Мышь/МИ	4	[26]
<b>Лизоцим</b>				
кДНК	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Корова/ПЯ	0.026	[17]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Свинья/ПЯ	0.00032	[27]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый (корова)	Коза/МИ	0.27	[28]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый (корова)	Мышь/МИ	0.00071	[29]
<b><math>\alpha</math>-Лактальбумин</b>				
Нативный ген	Бакмида	Корова/ПЯ	1.55	[30]

дукции целевого белка по сравнению с использованием кДНК [32, 33]. Например, в нескольких независимых исследованиях ген лактоферрина человека экспрессировали с использованием одного и того же вектора рВС1 (рис. 2Б). Если для получения ТЖ использовали кДНК, то концентрация рекомбинантного лактоферрина не превышала 4 мг/мл в молоке мышей и 0.7 мг/мл – в молоке трансгенных коз (табл. 1). При использовании нативного гена лактоферрина с интронами, длина которого составляет 50 т.п.н., получили трансгенных мышей, концентрация рекомбинантного лактоферрина в молоке которых достигала 160 мг/мл (табл. 1). Получены также трансгенные козы, содержащие одну копию конструкции, но экспрессирующие в молоке до 10 мг/мл рекомбинантного лактоферрина человека [22]. Аналогичной была разница в экспрессии рекомбинантного лактоферрина при использовании  $\alpha$ S1-казеинового промотора коров (табл. 1). Этот пример показывает, что присутствие интронов в кодирующей области трансгена примерно на порядок увеличивает содержание целевого белка в молоке.

Значительную роль в обеспечении эффективности экспрессии трансгена играет район интеграции конструкции в геном. Инъецированная ДНК обычно встраивается в области, бедные генами, в которых чаще происходят разрывы ДНК [13]. В таких райо-

нах хроматин обычно негативно влияет на экспрессию трансгена, встроенного поблизости. Кроме того, в один геномный сайт часто встраиваются несколько копий конструкции, что может, в свою очередь, приводить к репрессии транскрипции в результате формирования гетерохроматина на повторяющихся последовательностях.

Для защиты экспрессии трансгена от репрессии и поддержания прямой зависимости между количеством копий и уровнем экспрессии трансгена в культурах клеток млекопитающих используется ряд регуляторных элементов: А/Т-богатые участки ДНК, которые связываются с фракцией ядерного матрикса, названные MAR/SAR-элементами [34, 35]; регуляторные элементы (UCOE), активирующие промоторы генов «домашнего хозяйства» [36]; STAR-элементы, способные блокировать распространение гетерохроматина [37]; инсуляторы [38, 39].

Из всех перечисленных регуляторных элементов в векторных конструкциях для получения ТЖ используют только инсуляторы. Инсуляторами называют регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними [40, 41]. Кроме того, часть инсуляторов способна служить границей между транскрипционно активным хроматином и гетерохроматином. Один из наиболее хорошо изученных

инсуляторов позвоночных – инсулятор из кластера β-глобиновых генов кур (HS4-инсулятор), размером 1200 п.н., расположенный на 5'-конце β-глобинового локуса [42]. В нем выявлен коровый участок длиной 250 п.н., обладающий полной инсуляторной активностью. В данном участке идентифицирован сайт связывания белка CTCF, единственного охарактеризованного инсуляторного белка позвоночных [43]. CTCF отвечает за способность HS4-инсулятора блокировать энхансеры и помогает связываться с инсулятором белкам USF1 и USF2, которые формируют границу между активным хроматином и гетерохроматином [44]. Также с последовательностью HS4-инсулятора связывается белок BGP1/Vezf1 [45], защищающий GC-богатые последовательности инсулятора от метилирования, которое приводит к нарушению связывания инсуляторных белков с ДНК и, как следствие, к инактивации инсулятора. Согласно существующей модели, BGP1/Vezf1 также терминирует слабую транскрипцию, распространяющуюся из гетерохроматинового района, что может играть важную роль в защите β-глобинового локуса от распространения неактивного хроматина [46]. Созданный компанией «Invitrogen» (США) для получения ТЖ вектор рBC1 содержит две копии HS4-инсулятора длиной 1.2 т.п.н. на 5'-конце вектора (рис. 2Б). Детальный анализ влияния HS4-инсулятора на транскрипционную активность нескольких промоторов, в том числе β-казеинового промотора коз и WAP-промотора кроликов, показал, что инсулятор значительно повышает уровень экспрессии трансгена и количество трансгенных линий, в которых наблюдается значимая продукция целевого белка [22, 47–50]. В то же время HS4-инсулятор не влияет на вариабельность экспрессии трансгена и его эктопическую экспрессию в других тканях организма, не обеспечивает прямую зависимость между числом копий трансгена и уровнем его экспрессии. Таким образом, HS4-инсулятор выполняет роль универсального усилителя транскрипции, который можно использовать для увеличения активности слабых промоторов. Однако он не позволяет добиться эффективной экспрессии трансгена только в молочной железе, что важно для продукции многих целевых белков, негативно воздействующих на здоровье ТЖ.

Возможной альтернативой инсуляторам и другим регуляторным элементам может быть увеличение размера регуляторных последовательностей в трансгенной конструкции. Многие локусы, экспрессирующие гены белков молока, имеют протяженные 5'- и 3'-области, которые могут содержать как тканеспецифичные энхансеры, так и инсуляторы, способные обеспечивать защиту от влияния окружающих генов. Например, создана конструкция размером 50 т.п.н., в составе

которой кодирующая часть (3 т.п.н.) гена WAP мыши, состоящая из 24 т.п.н., была заменена на структурную часть гена лактоферрина человека длиной 29 т.п.н. [21]. В результате получили трансгенных мышей, в молочной железе которых наблюдалась высокая тканеспецифичная экспрессия трансгена, а продукция рекомбинантного лактоферрина человека достигала в молоке 30 мг/мл (табл. 1).

Еще один способ получения ТЖ, эффективно продуцирующих целевые белки, – интеграция в геном больших участков ДНК, достигающих 250 т.п.н. Для подготовки таких протяженных генных конструкций можно использовать векторы на основе бактериальных искусственных хромосом (бакмид), позволяющих проводить клонирование последовательностей размером до 400 т.п.н. [51, 52]. Регуляторные участки тканеспецифичных генов могут занимать большие геномные области и находиться в составе соседних генов. Например, несколько энхансеров, стимулирующих ген WAP свиньи, удалены на 140 т.п.н. от регулируемого ими гена и отделены от него другими генами [53]. При использовании больших фрагментов ДНК можно с высокой долей вероятности считать, что все регуляторные элементы данного гена включены в трансген. Предполагается, что при использовании такого подхода трансген специфично экспрессируется только в молочной железе, и влияние окружающего хроматина на экспрессию трансгена сводится к минимуму. Этот подход позволяет получить ТЖ, экспрессия трансгена в которых максимально соответствует экспрессии эндогенного аналога. Например, при помощи такого метода получены трансгенные коровы, экспрессирующие гены лактоферрина и α-лактальбумина человека (табл. 1). В целом этот метод позволяет добиться стабильной экспрессии трансгена на уровне нативного гена. Так, в трансгенных коровах продукция лактоферрина и альфа-лактальбумина достигала 3.4 и 1.55 мг/мл соответственно (табл. 1). Проблему представляют другие гены, которые входят в состав бакмиды и экспрессия которых может негативно влиять на здоровье ТЖ. Также необходимо отметить, что использование бакмиды не полностью подавляет влияние геномного окружения: экспрессия остается частично зависимой от места интеграции в геном [54, 55]. При этом не наблюдается прямой зависимости между числом копий бакмиды и уровнем экспрессии. Это может быть связано с тем, что запускаемая РНК-интерференция негативно влияет на экспрессию генов в бакмиде.

### ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

С начала 1990-х годов предпринимались попытки получения ТЖ, продуцирующих различные бел-

ки человека. В настоящее время эти белки нарабатывают в других системах экспрессии (бактериях, дрожжах, клетках млекопитающих). Большую часть рекомбинантных белков человека, которые производятся в культурах клеток млекопитающих, составляют белки плазмы крови [56]. Использование рекомбинантных белков плазмы крови растет с каждым годом, так как расширяется сфера их применения, а использование тканей человека для выделения нативных белков ограничено из-за существующего риска вирусной контаминации, малого числа доноров и этических причин. Факторы свертывания крови VII, VIII и IX применяют для пожизненной терапии наследственных заболеваний. Несмотря на высокий уровень очистки белков, получаемых в бактериальных или дрожжевых системах, со временем у большинства больных возникает иммунный ответ на терапию, что обуславливает необходимость замены препарата на аналогичный, но произведенный другим способом. Поэтому продукция рекомбинантных факторов свертывания крови в молоке ТЖ имеет важное медицинское значение [57]. В табл. 2 приведены некоторые примеры ТЖ, в молоке которых содержатся факторы свертывания крови человека. В большей части случаев для терапии заболеваний крови необходимо сравнительно небольшое количество (исчисляемое граммами) РБ. Вследствие этого оптимальным ТЖ для производства РБ считается кролик: от каждой трансгенной крольчихи можно получить около 5 л молока за лактацию или 20 г РБ в год. Полученные результаты показывают, что экспрессия факторов свертывания крови не влияет на здоровье и лактацию животных [74, 75].

В отличие от факторов свертывания крови VII, VIII и IX, потребности в рекомбинантном альбумине исчисляются тоннами, так как альбумин, помимо медицины, используется в биотехнологии для стабилизации других белков. Альбумин – основной белок крови, который обычно выделяют из плазмы. Производство рекомбинантного альбумина дороже выделения его из плазмы крови, так как для медицинских целей необходима очень высокая степень очистки. В настоящее время рекомбинантный альбумин преимущественно производится в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* (Recombumin™) и *Pichia pastoris* (Albrec™). Огромные потребности в рекомбинантном альбумине определили выбор трансгенных коров для его производства. Так, недавно GTC Biotherapeutics (США) получила трансгенных коров, продукция рекомбинантного альбумина человека (рЧАБ) в молоке которых в среднем составила 1–5 мг/мл [15] или до 30 кг на одну корову-производителя в год. В той же работе была описана одна линия трансгенных коров, в молоке которых концентрация

рЧАБ достигала 48 мг/мл, что определялось интеграцией 250 копий конструкции. Трансгенные коровы этой линии обладали более коротким периодом лактации и снижением удоя, поэтому можно предположить, что продукция рЧАБ в молоке трансгенных коров должна быть ниже 48 мг/мл.

Некоторые белки, такие, как гормоны и цитокины, негативно влияют на лактацию и здоровье ТЖ. В результате возникает проблема с поддержанием трансгенного стада. Наиболее показательным является проект, осуществляемый фирмой «PharmAthene Inc.» (США) по заданию Министерства обороны США, по получению бутирилхолинэстеразы (табл. 2), высокоактивного фермента, эффективно защищающего от фосфорорганических отравляющих веществ. В результате получено стадо коз, в котором уровень рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рЧБХЭ) в молоке составлял 1–5 мг/мл [59]. Основная проблема, с которой столкнулась компания, – влияние рЧБХЭ на лактацию, что значительно снизило продуктивность трансгенных коз [76]. В результате встал вопрос об экономической целесообразности использования трансгенных коз для получения рЧБХЭ.

Существует несколько подходов, при помощи которых удастся продуцировать РБ, негативно влияющие на лактацию и здоровье ТЖ, однако они только частично решают проблему. Во-первых, можно найти промотор, который стабильно работает исключительно в молочной железе на достаточно низком уровне. Например, с использованием промотора гена β-казеина без энхансера (табл. 2) в трансгенных козах продуцировали рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (рЧГ-КСФ) [60]. Однако концентрация рЧГ-КСФ в молоке этих коз не превышала 0.05 мг/мл. Были также получены трансгенные мыши, молоко которых содержало 0.02–0.04 мг/мл рЧГ-КСФ. Использовали также экспрессирующий вектор, содержащий 5'-регуляторную область гена *CSN1S1* козы (3387 п.н.), включающую первый интрон, и 3'-область гена *CSN1S1* коровы (1518 п.н.) с некодирующими экзонами 18 и 19 [67]. В результате показали, что в трансгенных мышцах, несущих этот вектор, рЧГ-КСФ экспрессируется только в молоке, но не в других тканях. Однако низкий уровень РБ в молоке снижает экономическую привлекательность данного подхода.

Альтернативным способом получения РБ, негативно влияющих на здоровье ТЖ, является заражение молочной железы векторами на основе аденовирусов, дефектных по репликации. Например, в лаборатории трансгенеза и клонирования животных (Гавана, Куба) получили аденовирусный вектор, предназначенный для экспрессии рекомбинантного эритропоэ-

Таблица 2. Примеры экспрессии рекомбинантных белков (РБ) человека в молоке трансгенных животных (ТЖ)

РБ (конструкция)	Регуляторные элементы	ТЖ/способ получения	Максимальный уровень экспрессии РБ в молоке, мг/мл	Ссылка
Альбумин (нативный ген)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Корова/ПЯ	40	[15]
Альфа-фетопротеин (нативный ген)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/ПЯ	1.1	[58]
Бутирилхолинэстераза (кДНК)	—“—	Коза/ПЯ	5	[59]
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (нативный ген)	—“—	Коза/МИ	0.05	[60]
Гормон роста (нативный ген)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Коза/ПЯ	0.07	[61]
Антитромбин (кДНК)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Коза/МИ	2	[62]
Фактор свертывания крови IX (мини-ген)	—“—	Мышь/МИ	0.026	[63]
Тканевый активатор плазминогена (кДНК)	—“—	Коза/МИ	3	[64]
Фактор свертывания крови IX (кДНК)	$\beta$ -казеиновый промотор (корова)	Коза/МИ	$9.5 \times 10^{-5}$	[65]
Гормон роста (нативный ген)	$\beta$ -казеиновый промотор (корова)	Корова/ПЯ	5	[66]
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (нативный ген)	$\alpha$ S1-казеиновый промотор (коза)	Мышь/МИ	0.04	[67]
Эритропоэтин (кДНК)	$\beta$ -лактоглобулиновый промотор (корова)	Мышь/кролик /МИ	0.3 (мышь) 0.5 (кролик)	[68]
Лизостафин (нативный ген)	$\beta$ -лактоглобулиновый промотор (овца)	Корова/ПЯ	0.014	[69]
Лизостафин (кДНК)	$\beta$ -лактоглобулиновый промотор (овца)	Мышь/МИ	1.3	[70]
S1-ингибитор эстеразы (нативный ген)	WAP-промотор (мышь)	Кролик/МИ	1.8	[71]
Фактор свертывания крови IX (кДНК)	WAP-промотор (мышь)	Свинья/МИ	4	[72]
Фактор свертывания крови VIII (кДНК)	WAP-промотор (мышь)	Кролик/МИ	0.1	[73, 74]

тина человека. В молоке зараженных этим аденовирусом коз концентрация эритропоэтина достигала 2 мг/мл, но он обладал низкой биологической активностью, что, как полагают, связано с недостаточным уровнем гликозилирования белка, полученного таким способом [77]. Описано получение с помощью аденовирусных векторов рекомбинантного гормона роста человека в мышах (2 мг/мл) и козах (0.3 мг/мл) [78]. Аналогичный подход использовали и в случае рекомбинантного лактоферрина человека, концентрация которого в молоке коз достигала 2 мг/мл [79]. Несмотря на простоту получения с помощью аденовирусного вектора животных, экспрессирующих целевой белок в молоке, этот метод не позволяет обеспечить стабильную экспрессию рекомбинантного белка

на уровне, достаточном для его промышленного производства. Высокий уровень экспрессии (1.5–2 мг/мл) наблюдался только в течение первых 25 дней лактации, что можно объяснить либо естественным отмиранием трансфицированных клеток, либо иммунным ответом на инфекцию.

Наконец, перспективным способом считается продукция белков в неактивной форме. Например, для получения рекомбинантного эритропоэтина человека создан экспрессирующий вектор, в котором кДНК эритропоэтина встроена в пятый экзон гена лактоглобулина коров [68] таким образом, чтобы между кодирующими областями двух генов находился участок, расщепляемый IgA-протеазой. В результате были получены трансгенные мыши и кролики,

в молоке которых концентрация химерного белка достигала 0.3 и 0.5 мг/мл соответственно. После разрезания химерного белка IgA-протеазой активность эритропоэтина восстанавливалась, при этом лактация и здоровье ТЖ не нарушились. Возможно также использовать коэкспрессию РБ и ингибитора, блокирующего его активность. Так, экспрессируемая в молоке рекомбинантная проурокиназа человека почти сразу же превращается в активную форму – урокиназу, что делает такой биореактор бесперспективным для получения лекарственной формы белка (проурокиназы). Для решения этой проблемы проурокиназу коэкспрессировали в молоке трансгенных мышей с бактериальным ингибитором сериновых протеаз [80]. Это позволило очистить молоко трансгенных мышей от процессированной проурокиназы (урокиназы) и резко повысить выход лекарственной формы этого белка.

Необходимо отметить, что сиалирование РБ в молоке трансгенных кроликов и свиней наиболее сходно с сиалированием в клетках человека, что имеет принципиальное значение для снижения иммуногенности препаратов при длительной терапии [81, 82]. В молоке же трансгенных коз и коров могут происходить неправильные посттрансляционные модификации, снижающие активность рекомбинантного белка. Наиболее простой способ удаления неправильной модификации – мутирование в белке сайта, по которому происходит нежелательная модификация. Например, альфа-фетопротеин, одноцепочечный гликозилированный белок 68 кДа сыворотки крови, используется в терапии аутоиммунных заболеваний. Потребность в правильно свернутом рекомбинантном альфа-фетопротеине человека (рчАФП) очень высока (требуются килограммы белка), поэтому компания «Merrimack Pharma» (США) совместно с «GTC Biotherapeutics» (США) запустила проект по получению трансгенных коз, продуцирующих с молоком рчАФП. Альфа-фетопротеин человека, выделенный из молока трансгенных коз, оказался гликозилированным по остатку аспарагина в положении 233, что значительно снижало его активность. Поэтому в рчАФП заменили остаток аспарагина на глутамин, что привело к инактивации сайта гликозилирования [58, 83]. При этом показано, что биологическая активность и фармакокинетика мутантного варианта альфа-фетопротеина были такими же, как у нативного белка.

Рынок мАТ относится к наиболее быстро развивающимся сегментам фармацевтической индустрии. В 2007 году терапевтические мАТ, основная часть которых применяется при онкологических и аутоиммунных заболеваниях, принесли биотехнологическим компаниям США более 26 млрд долларов [84].

В настоящее время используемые в медицине мАТ производятся исключительно в культурах клеток млекопитающих, так как для терапевтической эффективности необходимы правильные посттрансляционные модификации мАТ. К наиболее важным модификациям относятся присоединение олигосахаридов и сиаловой кислоты, которые значительно увеличивают время циркуляции мАТ в кровеносном русле и снижают их иммуногенность. Однако РБ, получаемые в культурах клеток, имеют сравнительно высокую себестоимость. Поэтому в конце 1990-х годов была предпринята попытка использования ТЖ в качестве продуцентов антител [85, 86]. Так как мАТ состоят из двух полипептидных цепей, то для их экспрессии в ТЖ использовались две конструкции, которые содержали гены, кодирующие тяжелую и легкую субъединицы. Обычно при получении ТЖ в один геномный сайт встраивается несколько конструкций, кодирующих тяжелую и легкую цепь антител. В первых работах мАТ экспрессировали с использованием различных промоторов генов белков молока, например,  $\beta$ -лактоглобулина овцы [87] и WAP мыши [88, 89]. В результате получили трансгенных мышей, в молоке которых содержались мАТ в достаточно высоких концентрациях 0.4–5 мг/мл (табл. 3). В дальнейшем мАТ с целью создания фармацевтического производства получали в трансгенных козах, а для тестирования экспрессионных векторов, качества мАТ и отработки метода их выделения использовали трансгенных мышей. При этом для экспрессии мАТ получил распространение описанный выше вектор рBC1 (рис. 2Б). С помощью этого вектора получены наиболее высокие уровни экспрессии мАТ в трансгенных мышцах, достигавшие 32 мг/мл молока (табл. 3). Однако данные по уровню экспрессии мАТ в молоке трансгенных коз в открытой печати практически отсутствуют. Только в одном обзоре [86] упоминаются трансгенные козы, у одной из которых уровень экспрессии достигал 14 мг/мл.

Согласно данным фирмы «GTC Biotherapeutics» (США), мАТ, выделенные из молока трансгенных коз, обычно бывают стабильными и высокоэффективными, причем даже высокий уровень экспрессии мАТ не влияет на здоровье и лактацию трансгенных коз. Фирмой разработаны достаточно простые методы получения высокоочищенных мАТ, пригодных для использования в медицинских целях [95, 96]. Проведенные исследования позволяют считать трансгенных коз оптимальными для производства мАТ [97]. Привлекательность трансгенных коз обусловлена также тем, что они реже болеют коровьим бешенством по сравнению с овцами и коровами. В настоящее время для производства РБ из молока трансгенных коз используют животных из Новой Зеландии или Ав-

Таблица 3. Примеры продукции мАТ в молоке трансгенных животных (ТЖ)

Антиген, с которым связывается антитело	Регуляторные элементы	ТЖ/конструкции	Максимальный уровень продукции антител в молоке, мг/мл	Ссылка
CD6-рецептор	WAP-промотор (кролик)	Мышь/два нативных гена	0.4	[90]
S-гликопротеин оболочки (коронавирус гастроэнтерита)	WAP-промотор (мышь)	Мышь/два нативных гена	5	[89]
S-гликопротеин оболочки (вирус гастроэнтерита)	$\beta$ -лактоглобулиновый промотор (овца)	Мышь/две кДНК	6	[91]
BR96 анти-Lewis Y	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Мышь/два нативных гена	14	[86]
BR96 анти-Lewis Y	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Мышь/два нативных гена	4	[86]
CD20-рецептор	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	—“—	22.3	[92]
Антиген белка оболочки (вирус гепатита А)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	—“—	32	[93]
B-антиген белка оболочки (вирус гепатита В)	—“—	—“—	17.8	[94]

стралии, так как официально считается, что в этих странах коровьего бешенства нет.

В настоящее время потребность во многих мАТ достигает нескольких сотен килограмм в год. Так, мировые потребности в мАТ к рецептору CD20 превышают 600 кг в год. Подсчитано, что стадо, состоящее из 210 трансгенных коз, в молоке которых содержится мАТ в концентрации 8 г/л, может полностью обеспечить мировые потребности в мАТ к CD20 с примерной себестоимостью 100 \$/г [85]. В то же время для получения такого же количества мАТ необходимо 51 000 л клеточной культуры при производительности 1 г/л и примерной себестоимости 300 \$/г.

Несмотря на сравнительно низкую себестоимость производства мАТ в трансгенных козах, существует ряд недостатков в их использовании по сравнению с культурами клеток млекопитающих. Во-первых, антитела должны быть правильно гликозилированы и сиалированы, что имеет важное значение для их стабильности, иммуногенности и биологической активности. В молочных железах трансгенных коз происходит гликозилирование и сиалирование, но оно может быть неполным. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии мАТ эффективность гликозилирования падает. Поэтому оптимальным уровнем мАТ в молоке считается 2–4 мг/мл. Вторая проблема состоит в том, что сиаловая кислота в трансгенных козах представлена *N*-ацетилнейраминовой кислотой (NANA) [98], в то время как у людей антитела содержат *N*-гликозилнейраминовую кислоту (NGNA). Существует вероятность того, что антитела с «неправильной» сиаловой кислотой в некоторых случа-

ях могут оказаться иммуногенными для пациентов. В культурах клеток млекопитающих рекомбинантные белки также имеют гетерогенное гликозилирование и сиалирование, и обычно оно не полностью соответствует нативному варианту. Для преодоления этой проблемы в клеточные линии, продуцирующие рекомбинантные белки, вводят дополнительные гены, которые кодируют транспортеры и ферменты, усиливающие уровень гликозилирования и сиалирования, и/или гены, РНК-продукт которых индуцирует инактивацию генов, кодирующих белки, негативно влияющие на гликозилирование [99, 100]. В последнее время с разработкой новых технологий сайт-направленного мутагенеза появилась возможность инактивировать в клеточных линиях гены, вовлеченные в гликозилирование РБ, отличное от гликозилирования в клетках человека. Аналогичные подходы неприменимы для животных-продуцентов, так как изменения в геноме могут негативно отразиться на жизнеспособности ТЖ. Единственный потенциально возможный вариант – создание ТЖ с использованием вектора под строгим контролем экспрессии только в молочной железе. Такой вектор должен экспрессировать дополнительные гены, усиливающие/модифицирующие гликозилирование, и гены, кодирующие группы РНК, способные инактивировать гены, белковые продукты которых ответственны за неправильное гликозилирование РБ. Наконец, проблему при очистке мАТ из молока представляет присутствие в козьем молоке около 0.3–0.5 мг/мл эндогенных иммуноглобулинов. Поэтому для получения высокоочищенных мАТ необходима эффективная хроматографическая стадия

разделения козьих и человеческих иммуноглобулинов [86]. В то же время с внедрением синтетических сред для культивирования клеточных культур заметно упростилась стадия очистки рекомбинантных белков, что несколько снизило себестоимость получения высокоочищенных мАТ.

Недавно показали, что отсутствие фукозы в гликоцепи антитела позволяет индуцировать цитотоксичность при концентрации антитела в десятки раз меньшей, чем при использовании обычных антител [101]. Для получения таких дефукозилированных антител экономически выгодной могла бы стать платформа на основе трансгенных кроликов. Интересно, что в рекомбинантном С1-ингибиторе человека, выделенном из молока трансгенных кроликов, не найдены остатки фукозы, что предполагает отсутствие активного фукозилирования в молочных железах кролика. Таким образом, трансгенные кролики могут стать привлекательной платформой для производства этого нового класса высокоактивных антител.

Широкомасштабный проект по получению мАТ в ТЖ был начат в конце 1990-х годов фирмой «Genzyme Transgenic» (в настоящее время – «GTC Biotherapeutics»), которая заключила контракты с большим числом фирм-разработчиков мАТ как терапевтических средств. На первом этапе мАТ для оценки их общей активности получали в трансгенных мышцах. Если уровень экспрессии и биологическая активность мАТ в трансгенных мышцах соответствовали ожидаемым, то на втором этапе получали коз-продуцентов. В настоящее время компания «GTC Biotherapeutics» разрабатывает технологию производства нескольких широко используемых мАТ (Rituximab®, Herceptin®, Humira® и Erbitux®) в трансгенных козах. Работы по получению мАТ в трансгенных козах также активно ведутся в Китае и Новой Зеландии.

### **ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ**

На данный момент FDA близок к принятию положительного решения по коммерческому использованию лосося, экспрессирующего гормон роста (AquAdvantage), который, согласно заключению, безопасен и для человека, и для окружающей среды [11, 102]. Экономический эффект в случае трансгенного лосося связан с ускорением роста почти в 2 раза, что значительно снижает себестоимость разведения. В связи с этим можно предполагать, что уже в ближайшем будущем будет получено разрешение на коммерческое применение различных ТЖ, с помощью которых могут быть достигнуты такие значимые цели, как 1) получение модифицированного молока, содержащего РБ человека; 2) изменение со-

става молока для увеличения эффективности получения молочных продуктов; 3) улучшение свойств сельскохозяйственных животных (быстрый рост, переработка отходов); 4) повышение устойчивости сельскохозяйственных животных к бактериальным, вирусным и прионным инфекциям [103].

В настоящее время все более актуальной становится проблема искусственного вскармливания новорожденных и питания детей раннего возраста. По своему составу грудное молоко значительно отличается от козьего и коровьего. Так, в молоке человека намного выше концентрация лактоферрина (2.0–5.8 мг/мл), лизоцима (0.03–3 мг/мл) и лактальбумина (1.8–3.1 мг/мл). Эти белки защищают организм от инфекций, улучшают структуру эпителия кишечника, положительно влияют на микрофлору кишечника и усиливают иммунитет. В то же время концентрация этих белков в коровьем молоке намного ниже: 0.03–0.49 мг/мл лактоферрина, 0.05–0.22 мг/мл лизоцима и 1.47 мг/мл лактальбумина. Смеси для искусственного вскармливания, изготовленные на основе молока животных, не обеспечивают оптимального питания младенцев, поскольку готовятся на основе гидролизатов и не содержат функциональных белков.

В Китае для получения модифицированного молока получили трансгенных коров, которые экспрессируют рекомбинантный лактоферрин (3.4 мг/мл) [16], лизоцим (0.03 мг/мл) [17] или лактальбумин человека (1.5 мг/мл) [33]. В дальнейшем планируется начать производство молока, которое содержит все три РБ человека в оптимальной концентрации. В США получены трансгенные козы, молоко которых содержит рекомбинантный лизоцим человека в концентрации 0.27 мг/мл [31], что составляет 67% от концентрации лизоцима в грудном молоке. Показано, что пастеризованное молоко с лизоцимом человека положительно влияет на здоровье молодняка коз и свиней [104, 105]. В настоящее время Университет Дэвиса (США) совместно с Институтом биомедицины федерального университета Сeará (Бразилия) получил грант от правительства Бразилии для изучения возможности использования молока, содержащего рекомбинантный лизоцимом человека, при диарее у детей из малообеспеченных семей. Также планируется получить трансгенных коз, экспрессирующих в молоке рекомбинантный лактоферрин, для последующего производства молока, содержащего одновременно два белка человека.

Новозеландская государственная компания «AgroResearch» создает трансгенных коров с целью повышения эффективности получения сыров. Примерно 80% белков молока составляют наиболее ценные белки – казеины. При этом фракция казеинов ко-

ровьего молока состоит из  $\alpha S1$ -,  $\alpha S2$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов, кодируемых одной копией гена каждый [106]. Казеины агрегируют в большие мицеллы. Мицеллярная структура и ее стабильность могут меняться в зависимости от соотношения казеинов, что влияет на физико-химические свойства молока. Сыр образуется путем агрегации казеиновых мицелл, которые, формируя белковую сеть, задерживают воду и жир. Увеличенное содержание  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов приводит к уменьшению размера мицелл и повышает температурную устойчивость, что необходимо для производства сыра [107]. С целью увеличения количества  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов в молоке были получены трансгенные коровы, содержащие дополнительные копии соответствующих генов [108]. При этом использовали эндогенный ген  $\beta$ -казеина коров с его регуляторными последовательностями. Так как ген  $\kappa$ -казеина обладает сравнительно низким уровнем экспрессии, то для получения трансгенных коров использовали химерный ген, содержащий регуляторную область гена  $\beta$ -казеина и кодирующую часть гена  $\kappa$ -казеина. В результате получили трансгенных коров, в молоке которых уровень  $\beta$ -казеина был увеличен на 20%, а  $\kappa$ -казеина – в 2 раза. Этот результат наглядно показывает возможность изменения состава молока методом трансгенеза, что может повысить эффективность многомиллиардного сырного производства.

Одной из проблем свиноводства является высокая смертность поросят, обусловленная недостатком  $\alpha$ -лактальбумина в молоке. Для решения этой проблемы получили трансгенных свиней, в геном которых был встроен ген  $\alpha$ -лактальбумина коров, что привело к увеличению концентрации лактозы в молоке [109]. В результате значительно снизилась смертность поросят, вскормленных модифицированным молоком. Другая проблема свиноводства – загрязнение окружающей среды их фекалиями, содержащими высокую концентрацию фосфора. Для решения этой проблемы получили трансгенных свиней, в геном которых был встроен бактериальный ген, кодирующий фитазу [110]. В результате уровень фосфатов в фекалиях трансгенных свиней снизился на 75%.

Устойчивость к заболеваниям – другой чрезвычайно важный аспект применения трансгенеза в сельском хозяйстве. Так ущерб от мастита (воспаления молочной железы, вызванного бактериальной инфекцией) крупного рогатого скота только в США составляет более 1.7 млрд долларов в год [111]. Обычно мастит вызывается стафилококками. Бактерицидным эффектом против стафилококков, вызывающих мастит, обладает лизостафин – мощная пептидогликангидролаза, секретируемая *Staphylococcus simulans*. Были получены трансгенные коровы [69], в молоке которых содержался лизостафин (на уровне

0.014 мг/мл). Показано, что у таких коров повысилась устойчивость к стафилококковым инфекциям.

Наиболее опасное заболевание крупного рогатого скота в странах северного полушария – синдром губчатой энцефалопатии, известный также как коровье бешенство. Для борьбы с этим заболеванием предложено удалять ген прионного белка [112], который вызывает заболевание. В результате получили трансгенных коров без этого гена, которые обладали устойчивостью к заражению коровьим бешенством [113]. Очевидно, что использование таких коров может снизить вероятность появления и распространения эпидемий коровьего бешенства.

Приведенные примеры показывают перспективность использования ТЖ в сельском хозяйстве. Основным фактором, сдерживающим распространение ТЖ, – это опасение населения по поводу безопасности трансгенных продуктов. Из-за этого ужесточаются требования регулирующих органов, что усложняет получение разрешения на использование ТЖ. В 2009 году (действующая редакция от 17 мая 2011 года), после более чем 10 лет работы, в FDA была разработана процедура рассмотрения заявок на использование ТЖ [114]. В развивающихся странах процедура одобрения новых продуктов проще, а власти и население лучше относятся к ТЖ, как к одному из способов решения проблемы обеспечения продовольствием и повышения уровня жизни населения. Вследствие этого большинство проектов по использованию ТЖ в сельском хозяйстве в настоящее время осуществляются в таких странах, как Бразилия, Аргентина и Китай.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 20 лет созданы эффективные технологии получения ТЖ – продуцентов РБ. ТЖ открывают возможности значительного снижения себестоимости производства МАТ и РБ человека с посттрансляционными модификациями, очень близкими к модификациям в белках человека.

До последнего времени основными причинами, по которым в развитых странах не производили РБ с использованием ТЖ, были отсутствие разработанного законодательства, регулирующего использование ТЖ, строгие этические нормы и протесты населения против использования животных в качестве биореакторов.

Однако в настоящее время ситуация начинает меняться – разработаны подробные правила, регламентирующие использование ТЖ для производства РБ. Создание двух одобренных регуляторными органами США и Евросоюза производств РБ из молока ТЖ сняло многие вопросы, связанные с организацией производства, а истечение срока действия патентов

на многие биопрепараты усилило конкуренцию среди производителей, что заставляет их искать максимально выгодные с экономической точки зрения технологические платформы для производства. Таким образом, можно ожидать, что в ближайшем будущем ТЖ найдут широкое применение в биотехнологической и пищевой промышленности. ●

*Работа поддержана  
ФЦП «Исследования и разработки по  
приоритетным направлениям развития научно-  
технологического комплекса России  
на 2007–2013 годы» (государственные контракты  
№ 16.512.12.2007 и 16.552.11.7067).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demain A.L., Vaishnav P. // *Biotechnology Advances*. 2009. V. 27. P. 297–306.
2. Durocher Y., Butler M. // *Curr. Opin. Biotech.* 2009. V. 20. P. 700–707.
3. Hammer R.E., Brinster R.L., Rosenfeld M.G., Evans R.M., Mayo K.E. // *Nature*. 1985. V. 315. P. 413–416.
4. Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M.A. // *Trends Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 394–399.
5. Echelard Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996. V. 7. P. 536–540.
6. Houdebine L.-M. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009. V. 32. P. 107–121.
7. Redwan el-R.M. // *J. Immunoassay Immunochem.* 2009. V. 30. P. 262–290.
8. Rudolph N.S. // *TIBTECH*. 1999. V. 17. P. 367–374.
9. Soler E., Thepot D., Rival-Gervier S., Jolivet G., Houdebine L.-M. // *Reprod. Nutr. Dev.* 2006. V. 46. P. 579–588.
10. BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products in the US and European Markets. [http://biopharma.fmsdb.com/biopharma7.lasso?S=index&DB\\_test=DD&-nothing](http://biopharma.fmsdb.com/biopharma7.lasso?S=index&DB_test=DD&-nothing)
11. Vázquez-Salat N., Salter B., Smets G., Houdebine L.-M. // *Biotechnology Advances*. 2012. V. 30. № 6. P. 1336–1343.
12. Kues W.A., Niemann H. // *Prev. Vet. Med.* 2011. V. 102. P. 146–156.
13. Goldman I.L., Kadullin S.G., Razin S.V. // *Med. Sci. Monit.* 2004. V. 10. P. RA274–285.
14. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. // *Nature*. 1997. V. 385. P. 810–813.
15. Echelard Y., Williams J.L., Destrepes M.M., Koster J.A., Overton S.A., Pollock D.P., Rapiejko K.T., Behboodi E., Masiello N.C., Gavin W.G., et al. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 361–376.
16. Yang P., Wang J., Gong G., Sun X., Zhang R., Du Z., Liu Y., Li R., Ding F., Tang B., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3453.
17. Whyte J.J., Prather R.S. // *Mol. Reprod. Dev.* 2011. V. 78. P. 879–891.
18. Zhang Y., Yang Z., Yang Y., Wang S., Shi L., Xie W., Sun K., Zou K., Wang L., Xiong J., et al. // *J. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 3. P. 132–141.
19. Honaramooz A., Yang Y. // *Vet. Med. Int.* 2010. pii: 657860.
20. Garrels W., Mátés L., Holler S., Dalda A., Taylor U., Petersen B., Niemann H., Izsvák Z., Ivics Z., Kues W.A. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e23573.
21. Shi G., Chen H., Wu X., Zhou Y., Liu Z., Zheng T., Huang P. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 573–582.
22. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Ya.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 513–519.
23. van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 484–487.
24. Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A., et al. // *Protein Expression and Purification*. 2008. V. 57. P. 127–135.
25. Platenburg G.J., Kootwijk E.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J.A., Pieper F.R., de Boer H.A., Strijker R. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 99–108.
26. Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Гольдман И.Л., Гурский Я.Г., Краснов А.Н., Попов А.Н., Георгиева С.Г., Кузнецов С.Л., Деревянко В.Г., Новикова Н.И. и др. // *ДАН*. 2009. Т. 427. С. 545–548.
27. Tong J., Wei H., Liu X., Hu W., Bi M., Wang Y., Li Q., Li N. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 417–419.
28. Maga E.A., Shoemaker C.F., Rowe J.D., BonDurant R.H., Anderson G.B., Murray J.D. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 518–524.
29. Maga E.A., Anderson G.B., Huang M.C., Murray J.D. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 36–42.
30. Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., et al. // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4466–4476.
31. Kabotyanski E.B., Rijnkels M., Freeman-Zadrowski C., Buser A.C., Edwards D.P., Rosen J.M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 22815–22824.
32. Choi T., Huang M., Gorman C., Jaenisch R. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. P. 3070–3074.
33. Whitelaw C.B., Archibald A.L., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. // *Transgenic Res.* 1991. V. 1. P. 3–13.
34. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. // *Biotech. Bioeng.* 2005. V. 91. P. 1–11.
35. Girod P.A., Nguyen D.Q., Calabrese D., Puttini S., Grandjean M., Martinet D., Regamey A., Saugy D., Beckmann J.S., Bucher P., et al. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. P. 747–753.
36. Benton T., Chen T., McEntee M., Fox B., King D., Crombie R., Thomas T.C., Bebbington C. // *Cytotechnology*. 2002. V. 38. P. 43–46.
37. Kwaks T.H.J., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R.G., Satijn D.P., Brons J.F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A.L., et al. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. P. 553–558.
38. Kwaks T.H.J., Otte A.P. // *Trends Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 137–142.
39. Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C.M. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 796–807.
40. Максименко О., Четверина Д., Георгиев П. // *Генетика*. 2006. Т. 42. С. 845–857.
41. Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development*. 2012. V. 139. P. 1045–1057.
42. Chung J.H., Bell A.C., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 575–580.
43. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // *Cell*. 1999. V. 98. P. 387–396.
44. West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D., Felsenfeld G. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 453–463.

45. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A.G. // *PLoS Genetics*. 2010. 6:e1000804.
46. Giles K.E., Gowher H., Ghirlando R., Jin C., Felsenfeld G. // *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biol.* 2010. V. 75. P. 1–7.
47. Giraldo P., Martinez A., Regales L., Lavado A., Garcia-Diaz A., Alonso A., Busturia A., Montoliu L. // *Nucl. Acids. Res.* 2003. V. 31. P. 6290–6305.
48. Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.-M., Montoliu L. // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 751–755.
49. Potts W., Tucker D., Wood H., Martin C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 273. P. 1015–1018.
50. Rival-Gervier S., Pantano T., Viglietta C., Maeder C., Prince S., Attal J., Jolivet G., Houdebine L.-M. // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 723–730.
51. Chandler K.J., Chandler R.L., Broeckelmann E.M., Hou Y., Southard-Smith E.M., Mortlock D.P. // *Mamm. Genome*. 2007. V. 18. P. 693–708.
52. Tong J., Lillico S.G., Bi M.J., Qing T., Liu X.F., Wang Y.Y., Zheng M., Wang M., Dai Y.P., Bruce C., Whitelaw A., Li N. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 933–938.
53. Saïdi S., Rival-Gervier S., Daniel-Carlier N., Thépot D., Morgenthaler C., Viglietta C., Prince S., Passet B., Houdebine L.-M., Jolivet G. // *Gene*. 2007. V. 401. P. 97–107.
54. Saux A.L., Houdebine L.-M., Jolivet G. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 923–931.
55. van Keuren M., Gavrulina G., Filipiak W., Zeidler M., Saunders T. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 769–785.
56. Burnouf T. // *Vox. Sanguinis*. 2011. V. 100. P. 68–83.
57. Lubon H. // *Biotechnol. Annu. Rev.* 1998. V. 4. P. 1–54.
58. Parker M.H., Birck-Wilson E., Allard G., Masiello N., Day M., Murphy K.P., Paragas V., Silver S., Moody M.D. // *Protein Expr. Purif.* 2004. V. 38. P. 177–183.
59. Huang Y.J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13603–13608.
60. Ko J.H., Lee C.S., Kim K.H., Pang M.G., Koo J.S., Fang N., Koo D.B., Oh K.B., Youn W.S., Zheng G.D., et al. // *Transgenic Res.* 2000. V. 9. P. 215–222.
61. Lee C.S., Lee D.S., Fang N.Z., Oh K.B., Shin S.T., Lee K.K. // *Reprod. Dev. Biol.* 2006. V. 30. P. 293–299.
62. Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 4561–4571.
63. Yan J.-B., Wang S., Huang W.-Y., Xiao Y.-P., Ren Z.-R., Huang S.-Z., Zeng Y.-T. // *Biochem. Genet.* 2006. V. 44. P. 349–360.
64. Ebert K.M., DiTullio P., Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J., Roberts B. // *Biotechnology (N.Y.)*. 1994. V. 12. P. 699–702.
65. Huang S., Zhang K., Huang Y., Chen M., Li H., Lu D., Lu J., Chen Y., Qiu X., Xue J., et al. // *Chin. Sci. Bull.* 1998. V. 43. P. 1317–1319.
66. Salamone D., Baranao L., Santos C., Bussmann L., Artuso J., Werning C., Prync A., Carbonetto C., Dabsys S., Munar C., et al. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. P. 469–472.
67. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. P. 485–498.
68. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Jänne O.A., Jänne J. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 245. P. 482–489.
69. Wall R.J., Powell A.M., Paape M.J., Kerr D.E., Bannerman D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N., Hawk H.W. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 445–451.
70. Kerr D.E., Plaut K., Bramley A.J., Williamson C.M., Lax A.J., Moore K., Wells K.D., Wall R.J. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 66–70.
71. Van Cott K.E., Lubon H., Russell C.G., Butler S.P., Gwazdauska F.C., Knight J., Drohan W.N., Velander W.H. // *Transgenic Res.* 1997. V. 6. P. 203–212.
72. van Cott K.E., Butler S.P., Russel C.G., Subbramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N., Velander W.H. // *Biomol. Engineering*. 1999. V. 15. P. 155–160.
73. Chrenek P., Vasicek D., Makarevich A.V., Jurcik R., Suvegova K., Bauer M., Parkanyi V., Rafay J., Batorova A., Paleyanda R.K. // *Transgenic Res.* 2005. V. 14. P. 417–428.
74. Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A.V., Uhrin P., Paleyanda R.K., Binder B.R. // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. P. 353–361.
75. Hiripi L., Makovics F., Halter R., Baranyi M., Paul D., Carnwath J.W., Bosze Z., Niemann H. // *DNA Cell Biol.* 2003. V. 22. P. 41–45.
76. Baldassarre H., Deslauriers J., Neveu N., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 1265–1272.
77. Toledo J.R., Sánchez O., Seguí R.M., García G., Montañez M., Zamora P.A., Rodríguez M.P., Cremata J.A. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 123. P. 225–235.
78. Sanchez O., Toledo J.R., Rodriguez M.P., Castro F.O. // *J. Biotechnol.* 2004. V. 114. P. 89–97.
79. Han Z.S., Li Q.W., Zhang Z.Y., Xiao B., Gao D.W., Wu S.Y., Li J., Zhao H.W., Jiang Z.L., Hu J.H. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 53. P. 225–231.
80. Gursky Y., Bibilashvili R., Minashkin M., Krasnov A., Deikin A., Ermolkevich T., Popov A., Verbovaya L., Rutkevich N., Shevelev A., et al. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 747–756.
81. Gil G.-C., Velander W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology*. 2008. V. 18. P. 526–539.
82. Koles K., van Berkel P.H., Pieper F.R., Nuijens J.H., Manne M.L., Vliegthart J.F., Kamerling J.P. // *Glycobiology*. 2004. V. 14. P. 51–64.
83. Parker M.H., Birck-Wilson E., Allard G., Masiello N., Day M., Murphy K.P., Paragas V., Silver S., Moody M.D. // *Protein Exp. Purif.* 2004. V. 38. P. 177–183.
84. Shukla A.A., Thommes J. // *Trends Biotech.* 2010. V. 28. P. 253–261.
85. Young M.W., Meade H., Curling J.M., Ziomek C.A., Harvey M. // *Res. Immunol.* 1998. V. 149. P. 609–610.
86. Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y., Meade H.M. // *J. Immunol. Meth.* 1999. V. 231. P. 147–157.
87. Simons J.P., McClenaghan M., Clark A.J. // *Nature*. 1987. V. 328. P. 530–532.
88. Shamay A., Solinas S., Pursel V.G., McKnight R.A., Alexander L., Beattie C., Hennighausen L., Wall R.J. // *J. Anim. Sci.* 1991. V. 69. P. 4552–4562.
89. Castilla J., Pintado B., Sola I., Sanchez-Morgado J.M., Enjuanes L. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 349–354.
90. Limonta J., Pedraza A., Rodriguez A., Freyre F.M., Barral A.M., Castro F.O., Leonart R., Gracia C.A., Gavilondo J.V., de la Fuente J. // *Immunotechnology*. 1995. V. 1. P. 107–113.
91. Sola I., Castilla J., Pintado B., Sanchez-Morgado J.M., Whitelaw C.B., Clark A.J., Enjuanes L. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3762–3772.
92. Tang B., Yu S., Zheng M., Ding F., Zhao R., Zhao J., Dai Y., Li N. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 727–732.
93. Zhang R., Rao M., Li C., Cao J., Meng Q., Zheng M., Wang M., Dai Y., Liang M., Li N. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 445–453.
94. Zhang R., Cui D., Wang H., Li C., Yao X., Zhao Y., Liang M., Li N. // *Transgenic Res.* 2012. DOI 10.1007/s11248-012-9589-z

95. Baruah G.L., Belfort G. // *Biotech. & Bioengineering*. 2004. V. 87. P. 274–285.
96. Baruah G.L., Nayak A., Wenkelman E., Belfort G. // *Biotech. & Bioengineering*. 2005. V. 93. P. 747–754.
97. Houdebine L.-M. // *Curr. Opin. Biotech.* 2002. V. 13. P. 625–629.
98. Raju T.S., Briggs J.B., Borge S.M., Jones A.J. // *Glycobiology*. 2000. V. 10. P. 477–486.
99. Bork K., Horstkorte R., Weidemann W. // *J. Pharm. Sci.* 2009. V. 98. P. 3499–3508.
100. Lim Y., Wong N.S.C., Lee Y.Y., Ku S.C.Y., Wong D.C.F. // *Biotech. Appl. Biochem.* 2010. V. 55. P. 175–189.
101. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 3466–3473.
102. van Eenennaam A.L., Muir W.M. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 706–710.
103. Murray J.D., Maga E.A. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 357–361.
104. Maga E.A., Cullor J.S., Smith W., Anderson G.B., Murray J.D. // *Foodborne Pathog. Dis.* 2006. V. 3. P. 384–392.
105. Brundige D.R., Maga E.A., Klasing K.C., Murray J.D. // *J. Nutr.* 2008. V. 138. P. 921–926.
106. Karatzas C.N., Turner J.D. // *J. Dairy Sci.* 1997. V. 80. P. 2225–2232.
107. Kang Y., Jimenez-Flores R., Richardson T. // *Basic Life Sci.* 1986. V. 37. P. 95–111.
108. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L’Huillier P., Laible G. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 157–162.
109. Wheeler M.B., Bleck G.T., Donovan S.M. // *Reprod. Suppl.* 2001. V. 58. P. 313–324.
110. Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 741–745.
111. Kerr D.E., Wellnitz O. // *J. Anim. Sci.* 2003. V. 81. P. 38–47.
112. Weissmann C., Enari M., Klöhn P.C., Rossi D., Flechsig E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 16378–16383.
113. Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N., Castilla J., Sathiyaseelan T., Vargas F. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 132–138.
114. 187 Guidance for Industry Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (CVM). 2009, 2011.

УДК 575.174.015.3:599.723

# Источники противоречий в оценке популяционно-генетических последствий чернобыльской аварии

В. И. Глазко\*, Т. Т. Глазко

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Москва, Тимирязевская, 49

\*E-mail: vglazko@yahoo.com

Поступила в редакцию 14.08.2012

**РЕФЕРАТ** В обзоре рассматриваются собственные и опубликованные данные о популяционно-генетических последствиях обитания разных видов млекопитающих в условиях высокого уровня ионизирующего облучения в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Представлены данные, свидетельствующие о том, что такие условия способствуют предпочтительному воспроизводству гетерозигот в полилокусных спектрах молекулярно-генетических маркеров, а также животных с относительно повышенной стабильностью хромосомного аппарата. Обсуждается перспективность использования репродуктивного «успеха» носителей этих характеристик в качестве интегрального показателя селективного действия факторов экологического стресса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ионизирующее излучение, молекулярно-генетические маркеры, репродуктивный «успех», цитогенетические аномалии, экологический стресс.

## ВВЕДЕНИЕ

Прошло 26 лет со дня наибольшей техногенной катастрофы XX века – аварии на Чернобыльской АЭС, которая высветила множество глобальных проблем индустриального и постиндустриального общества. С точки зрения системно-эволюционного подхода, процесс антропо- и социогенеза есть результат реализации уникальной, свойственной только *Homo sapiens*, стратегии выживания, стержневые элементы которой – одновременное сочетание биологической, социокультурной и технологической адаптации. Чернобыль показал несовместимость этих элементов. Наиболее мобильный из них, технологический, определяет общее направление истории человечества. Одомашнивание растений и животных, как условие перехода к оседлости, стало первым этапом формирования аграрной цивилизации и соответственно создания новых технологий, позволяющих приспособиться к меняющимся факторам окружающей среды. Культура, в том числе и культура производства, должна играть основную роль в координации всех трех составляющих адаптивной стратегии. Чернобыльская авария и отношение к ее последствиям, как и к последствиям многочисленных техногенных аварий и катастроф XX века, свидетельствуют о том, что культура развивается существенно медленнее, чем технологический прогресс и его биосферные по-

следствия. Наглядным примером тому служит сохраняющаяся до сих пор дискуссионность в оценках последствий для здоровья населения не только чернобыльской аварии, но и взрывов ядерных бомб в Хиросиме и Нагасаки.

До настоящего времени последствия экологических изменений для живых объектов только констатируются – подсчитываются исчезающие виды, оцениваются снижение их репродуктивной функции и изменение видовых сообществ. Противоречивость оценок последствий аварии Чернобыльской АЭС для биоты в очередной раз актуализирует еще более глобальную проблему – отсутствие достаточно надежных непротиворечивых оценок биобезопасности регионов проживания человека. Острая необходимость развития новых подходов к оценке биобезопасности обусловлена в основном двумя причинами: резким ускорением распространения загрязнителей и усложнением их состава. Традиционная экспертиза токсических агентов в воздухе, грунте и воде не включает постоянно возникающие новые загрязнители, а также не может учитывать их комбинационные эффекты, и, таким образом, нуждается в дополнительном анализе комплекса живых организмов – мишени действия токсических агентов. Очевидно, что одной из ключевых проблем является подбор индикаторных видов, популяционно-генетические изменения которых мо-

гут использоваться в качестве объективного показателя биобезопасности исследуемого региона.

Однако генетические последствия генотоксических воздействий чаще всего рассматривают только с точки зрения опасности появления мутантных организмов – носителей конститутивных мутаций, представленных во всех клетках многоклеточного организма. Частота их появления, особенно носителей таких масштабных генетических дефектов, как цитогенетические аномалии, может служить косвенным показателем той «чувствительной» к воздействию части генофонда, которая «уходит» из воспроизводства популяции, поскольку, как правило, у высших организмов носители конститутивных мутаций менее плодовиты, чем нормальные.

Основными причинами, затрудняющими объективную оценку повреждающего действия ионизирующего излучения, являются: гетерогенность по радиочувствительности рассматриваемых групп организмов на уровне видов, популяций, отдельных особей, различных тканей и органов; изменчивость радиочувствительности клеток одной и той же особи в онтогенезе и под влиянием факторов окружающей среды, в частности, активирующих или подавляющих активность разных звеньев антиоксидантной системы; сложность мутационных спектров и их вклада в соматические патологии, их связь с нарушением репродуктивной функции организмов.

Традиционно для оценки генотоксичности какого-либо воздействия или уровня загрязненности региона используют подсчет генных мутаций, хромосомных aberrаций и микроядерный тест у представителей различных индикаторных видов. Так, например, цитогенетические характеристики костного мозга мелких млекопитающих широко применяются в качестве биотеста для оценки экологической ситуации в различных регионах [1–5]. Однако накопленные данные наглядно свидетельствуют о широкой индивидуальной вариабельности как спонтанных частот встречаемости цитогенетических аномалий, так и их изменений в ответ на генотоксические воздействия.

Стабильность хромосомного аппарата – полигенный признак, контролируемый большим количеством факторов и генов, которые нельзя просто свести к ферментам репарации ДНК [6]. Так, анеуплоидия тесно связана с мутациями генов, контролирующих синхронность деления центросом со стадиями митоза. Нарушение такой синхронности приводит к многополюсным митозам с последующими ошибками расхождения хромосом по дочерним клеткам [7–10]. Хроническое или преходящее нарушение функции теломер, мутации или дисфункции генов белков теломер приводят к их слиянию, что служит источником глубокой геномной нестабильности [11, 12].

На уровне нуклеотидных последовательностей существует множество разных источников и механизмов геномной нестабильности, единственная общая черта которых – образование двухцепочечных разрывов ДНК (DSB) [13]. Следует отметить, что частоты мутаций в различных участках генома существенно зависят от целого ряда собственно геномных параметров (нуклеотидного контекста, времени репликации, плотности нуклеосом, модификаций гистонов, упаковки хроматина и ряда других) [14]. Именно это и затрудняет обычно оценку генотоксических эффектов в генетически гетерогенных популяциях, к которым относятся и популяции человека.

Проблема осложняется еще и тем, что «выход» мутаций в соматических клетках, количество мутантов в потомстве – это конечный этап многостадийного процесса. Наблюдаемые эффекты любого генотоксического воздействия будут зависеть от нескольких параметров, включая: 1) индивидуальную чувствительность данного организма к исследуемому воздействию (в частности, активность ферментов биотрансформации ксенобиотиков, систем антиоксидантной защиты); 2) генотипические характеристики активности ферментов репарации индуцируемых дефектов; 3) ферменты детоксикации токсических агентов, поступающих в клетки и образующихся в процессе внутриклеточного метаболизма; 4) скорость удаления поврежденных клеток.

По-видимому, именно полигенность перечисленных функций и приводит к широкому размаху индивидуальной изменчивости у групп млекопитающих в ответ на генотоксические воздействия одной и той же интенсивности.

Следует подчеркнуть, что неразвитость представлений о множественности мишеней повреждающего действия ионизирующего облучения в цитоплазме и ядре, в разных участках ДНК и о не менее сложных путях реализации таких повреждений в виде мутаций, а также о защитных системах многоклеточного организма, препятствующих накоплению мутантных клеток, приводит к тому, что прогнозы повреждающего действия, в частности для человека, существенно отличаются от накопленных эмпирических оценок.

Учитывая отсутствие информации о молекулярных каскадах событий, связанных с мутагенезом, очевидна проблематичность прогноза последствий воздействия ионизирующего облучения, если такой прогноз выполняется на основании оценок реализованных мутационных событий. Как правило, даже не обсуждаются специфические особенности мутагенеза разных элементов геномов, механизмы, скорость возникновения, биологические последствия которых существенно отличаются друг от друга.

В то же время, не изменив представлений о путях действия ионизирующего излучения на генетический материал биологических объектов, невозможно ожидать исчезновения противоречий между экспериментальными данными и прогнозами, основанными на слишком упрощенных представлениях и моделях мутагенного действия ионизирующего излучения на живые объекты.

### **ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИШЕНЕЙ У ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ. МОЛЕКУЛЯРНОЕ, КЛЕТОЧНОЕ, ОРГАННОЕ, ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ**

Одна из причин существующих затруднений состоит в том, что мутационные события с достаточно высокой частотой возникают и из-за эндогенных событий. Так, в клетках человека частота спонтанных мутаций в структурных генах составляет  $5 \times 10^{-11}$  в расчете на одно основание за одно клеточное деление [15]. В данном случае речь идет о частоте нуклеотидных замен в генах, приводящих к аминокислотным заменам в их белковых продуктах. У высших млекопитающих диплоидный геном содержит примерно  $6 \times 10^9$  нуклеотидов, около 10% которых входят в кодирующие последовательности, т.е. такая частота типична для  $6 \times 10^8$  нуклеотидов генома. Из этого следует, что в каждом геноме за один раунд репликации возникает около  $1 \times 10^{-3}$  мутаций в кодирующих участках структурных генов.

В настоящее время путем сравнительного анализа полностью секвенированных геномов родителей и двух однояйцовых близнецов частота мутаций определена в расчете на нуклеотид в гаплоидном наборе человека ( $3 \times 10^9$  нуклеотидов). Частота спонтанных замен при таком расчете достигает  $\sim 1.1 \times 10^{-8}$  на нуклеотид за одну репликацию [16].

У человека каждую секунду делится приблизительно  $10^7$  клеток [17], следовательно, каждую секунду появляется  $10^3$  клеток, несущих нуклеотидные замены только в белкокодирующих последовательностях. Важно подчеркнуть, что в данном случае речь идет о реализованных мутациях.

Однако таким мутациям предшествуют повреждения ДНК в потенциальных сайтах мутирования, поскольку они могут легко репарироваться, а могут и реализоваться в мутации. Их возникновение обычно обусловлено гидролизом, окислением или электрофильными воздействиями на молекулы ДНК. Эти реакции происходят в результате экзогенных воздействий, в том числе и ионизирующего излучения, они могут возникать и в результате эндогенных метаболических процессов. Эндогенными причинами обусловлено большое количество разнообразных повреждений

ДНК [17]. Так, например, апуриновые/апириимидиновые (AP) сайты в ДНК могут возникать в результате спонтанного гидролиза или эксцизионной репарации с участием ДНК-гликозилазы. AP-сайты быстро репарируются AP-эндонуклеазой, катализирующей гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи с последующим удалением 3'-фосфата (с участием лиазной активности ДНК-полимеразы  $\beta$ ) [18]. Накамура и Свенберг [19] подсчитали количество AP-сайтов в ДНК тканей. Они нашли, что количество таких сайтов в геноме клеток большинства тканей человека и грызунов достигает 50000–200000 (т.е. примерно  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  на нуклеотид). Видно, что такие повреждения возникают на 6–7 порядков чаще, чем замены нуклеотидов в структурных генах. Типичные AP-сайты индуцируют нуклеотидные замещения (обычно А → Т) или могут приводить к мутациям по типу сдвига рамки считывания. Подобные мутации обнаружены в микросателлитных локусах плазмиды после ее обработки  $H_2O_2$ . Количество AP-сайтов увеличивается при обработке клеток окисляющими или метилирующими агентами.

Достаточно давно известно, что воздействие кислородных радикалов приводит к появлению в ДНК множества окисленных оснований и к разрывам цепи. Менее часто обсуждают модификации оснований, которые возникают в результате других окислительных процессов. Так, полиненасыщенные жирные кислоты – одни из основных компонентов фосфолипидов мембран, характеризуются высокой чувствительностью к окислению и представляют собой главную мишень для кислородных радикалов [18]. При окислении полиненасыщенных жирных кислот образуются бифункциональные электрофильные группы, которые могут взаимодействовать с основаниями ДНК, приводя к возникновению экзоциклических соединений. Подобные модифицированные основания, несущие экзоциклические группы, нарушают двойную спираль ДНК и потенциально рассматриваются как высокомутагенные сайты.

Экзоциклические этеновые группы (обозначаемые как  $\epsilon$ :  $\epsilon A$ ,  $\epsilon C$  и  $N^2,3-\epsilon G$ ) обнаружены в ДНК из разных тканей человека, их уровень возрастает при повышении содержания кислородных радикалов. При окислительном стрессе в тканях грызунов находят  $N^2,3-\epsilon G$ . Количество  $\epsilon A$ ,  $\epsilon C$  повышено при болезни Вильсона и болезнях, связанных с накоплением в печени меди и железа [20]. При накоплении ионов металлов возрастает скорость окисления ненасыщенных жирных кислот. Уровень этеновых групп повышен также в ДНК полипов больных семейным аденоматозным полипозом, а также, что интересно, в ДНК лейкоцитов крови женщин, пища которых содержит большое количество ненасыщенных жирных кислот, при том что у мужчин этот эффект отсутствует [20].

Количество  $\epsilon A$ ,  $\epsilon C$  возрастает на стадии промотирования опухолей в двухстадийной мышинной модели рака кожи [21]. Обработка опухолевым промотором форболовым эфиром (тетрадеканойлфорбол-13-ацетат) приводит к 9–12-кратному увеличению  $\epsilon A$  и  $\epsilon C$  соответственно. Это повышение уровня повреждений ДНК коррелирует с индукцией оксигеназы жирных кислот (8-липоксигеназы).

Особое внимание уделяется в последнее время транзициям  $C \rightarrow T$  в CpG-островках, поскольку эти мутации очень часто выявляют при онкологических заболеваниях и ряде других патологий. Предполагается, что важным моментом в возникновении таких транзиций является метилирование цитозина.

Перестройки больших участков ДНК могут лежать в основе возникновения хромосомных транслокаций, приводящих, в частности, к утрате гетерозиготности, часто наблюдающейся в опухолевых клетках. Хромосомные изменения начинаются с двойных разрывов ДНК, индуцируемых окислительным стрессом или ферментативным расщеплением в процессе реорганизации хроматина (например, ДНК-топоизомеразой II). В ходе репликации ДНК возникает примерно 10 двойных разрывов ДНК на клеточный цикл в виде заблокированных репликативных вилок [22]. Очевидно, что факторы, приводящие к появлению двухцепочечных разрывов, как и пути их репарации, вносят важный вклад в процессы эндогенного мутагенеза.

Исследования на животных с дефицитом различных ферментов репарации двухцепочечных разрывов свидетельствуют о существенном вкладе таких модификаций в возникновение мутационных событий как на нуклеотидном, так и на хромосомном уровне.

В общем очевидно, что высокая частота спонтанных мутационных событий приводит к тому, что для реализации мутагенных эффектов ключевым становится не возникновение повреждений, а активность их репарации, как, например, у выживающего при облучении в 5000 Гр вида *Deinococcus radiodurans* [23].

Изучение механизмов спонтанного повреждения генетического материала, каждый из которых может реализоваться в мутацию с непредсказуемым эффектом как для клетки, ее клонального потомства, так и для многоклеточного организма в целом, свидетельствует о многоэтапности этих событий. Включение в этот каскад факторов ионизирующего излучения будет служить дополнительным источником повышения вероятности перехода потенциальных повреждений ДНК в мутации.

Следующий уровень контроля генетического постоянства многоклеточного организма, препятствующий накоплению мутантных клеточных клонов,

обусловлен разными вариантами гибели генетически дефектных клеток, а также участием клеток иммунной системы в элиминации мутантных клонов [24]. Очевидно, что на этой стадии ионизирующее излучение может обладать двойственным эффектом: увеличивать долю гибнущих мутантных клеток и ослаблять скорость их элиминации путем подавления эффекторных клеток иммунной системы.

Размножение мутантных клонов клеток герминативного ряда, появление мутантного потомства контролируются целым каскадом событий, каждое из которых может быть модифицировано действием ионизирующего излучения.

Интересно отметить, что в наших собственных исследованиях [25] было обнаружено, что у мышей линии CC57W/Mv под влиянием поглощенного ионизирующего облучения в дозе 0.4–0.5 Гр повышена (относительно контроля) доимплантационная смертность эмбрионов и замедлено дробление эмбрионов в условиях *in vitro*. Важно подчеркнуть, что доимплантационные эмбриональные потери у млекопитающих сложно контролировать, и проявляются они общим снижением плодовитости популяции.

Анализ событий мутагенеза на геномном, клеточном и организменном уровнях свидетельствует о том, что характеристики его изменений под влиянием низких доз ионизирующего излучения зависят от множества факторов, связанных как с генетически детерминированными процессами, так и с модифицирующим действием факторов окружающей среды. Сложность взаимодействий генетической и средовой компонентов не позволяет рассматривать отдельные характеристики мутагенеза как интегральные показатели влияния низких доз ионизирующего излучения на многоклеточные организмы. По-видимому, наиболее объективным показателем может быть снижение плодовитости популяции.

#### **ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПОВРЕЖДАЮЩИХ ЖИВЫЕ ОБЪЕКТЫ ДОЗАХ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ**

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных наблюдений последствий повышения уровня ионизирующего облучения у разных видов, в том числе и у человека. К самым распространенным способам оценки последствий повышения уровня ионизирующего облучения на здоровье относятся определение роста числа онкологических заболеваний; частот встречаемости делящихся клеток (как правило, в периферической крови) с повреждениями генетического аппарата; доли детей, родившихся с врожденными аномалиями [26]. К настоящему времени единственный показатель ухудшения здоровья населения после чернойбыльской аварии, который не вызывает спо-

ров, – увеличение частоты встречаемости рака щитовидной железы [26]. Особенностью данных о цитогенетических аномалиях в соматических клетках является высокая индивидуальная изменчивость характеристик дестабилизации хромосомного аппарата, а также отсутствие четких линейных зависимостей выраженности дестабилизации кариотипа от радионуклидной загрязненности места обитания [27], количества изотопов цезия в организме [28, 29].

Лабораторные и полевые исследования свидетельствуют о том, что повышение уровня ионизирующего излучения в ряде случаев, даже в низкодозовом диапазоне (до 20–30 мГр), сопровождается увеличением частоты особей, у которых повышена доля соматических клеток с различными мутациями [27, 29]. В то же время после Хиросимы и Нагасаки принято считать, что повышение частоты онкологических заболеваний, обусловленное увеличением уровня ионизирующего излучения, начинает отчетливо прослеживаться только после того, как поглощенная доза превысит 100 мЗв/год. Однако накопленные после чернобыльской аварии данные свидетельствуют о том, что повреждающие дозы могут быть существенно меньше, что требует пересмотра теории повреждающих доз [30]. Явное противоречие между наблюдением эффектов на уровне клеточных популяций, отдельных особей и статистическими среднепопуляционными анализами может иметь целый ряд причин, выяснение которых имеет особую важность для разработки объективных методов прогноза повреждающего действия ионизирующего излучения в низких дозах и поиска интегральных показателей такого действия.

Лейкоз – первое онкологическое заболевание, увеличение частоты которого связано с последствиями атомных взрывов в Хиросиме и Нагасаки, а пик наблюдался через 5 лет после бомбежки. Через 10 лет был отмечен рост числа солидных опухолей. Чаще всего встречался хронический лимфоцитарный лейкоз, рак поджелудочной и предстательной железы, а также матки. Даже через 55 лет после атомной бомбардировки 40% людей, изначально включенных в программу изучения переживших атомный взрыв, продолжают жить, что позволяет оценить долговременные последствия такого облучения. Оказалось, что относительный риск разных заболеваний на единицу дозы у выживших после бомбежек выше, чем у получивших медицинские дозы облучения. У работников атомных станций и шахтеров риск заболеть в среднем сопоставим с риском в некоторых группах населения, переживших взрывы атомных бомб. Риск соматических заболеваний у получивших первичное облучение в равных дозах уменьшается при увеличе-

нии возраста, в котором это произошло. У переживших атомную бомбардировку повышена частота различных заболеваний дыхательной, пищеварительной и сосудистой систем [31, 32].

После чернобыльской аварии в Англии, Шотландии, Греции, Германии, Белоруссии проанализировали связь между поглощенными плодом дозами и частотой развития лейкозов у детей. Суммарные поглощенные плодом дозы варьировали от 0.02 мЗв в Англии, 0.06 мЗв в Германии, 0.2 мЗв в Греции и 2 мЗв в Белоруссии. Выявлено статистически значимое повышение риска заболеть лейкозом у рожденных в пик облучения – от 01.07.1986 до 31.12.1987 по сравнению с детьми, рожденными между 01.01.1980 и 31.12.1985, а также между 01.01.1988 и 31.12.1990. В отдельных странах риск увеличивается немонотонно по сравнению с поглощенной дозой – резко возрастает при низких дозах, затем падает при высоких дозах. Полученные данные обсуждаются в связи с механизмами гибели плодов/клеток при высоких дозах и дозозависимой индукцией репарации ДНК. Накопленные результаты указывают на необходимость пересмотра представлений о повреждающих поглощенных дозах для плода [33]. У детей, получивших повышенные дозы ионизирующего излучения в период от 0 до 5 лет после рождения, также наблюдалось повышение частоты лейкозов, коррелирующей с поглощенными дозами (выше 10 мГр) [34]. Тем не менее важно подчеркнуть, что зависимость развития онкологических заболеваний от многих факторов одновременно (особенно лейкозов), сложность диагностики и классификации, а также успехи в лечении затрудняют оценку вклада радионуклидного загрязнения после чернобыльской аварии в динамику онкопатологии и ранней смертности в странах Европы [35].

В то же время имеются данные, согласно которым среди детей, рожденных от отцов-ликвидаторов, частота врожденных пороков развития превышает среднюю частоту в Российской Федерации [36]. Выполненный Г.И. Лазюком и коллегами анализ Белорусского национального регистра врожденных пороков развития за 1983–1999 годы позволил выявить рост рождаемости детей с врожденными пороками развития в регионах с высоким уровнем радионуклидного загрязнения после чернобыльской аварии [37].

Показано, что высокие и низкие дозы ионизирующего облучения оказывают беспороговые эффекты на сердечно-сосудистую систему. В формировании этих эффектов вовлечены по крайней мере два механизма: воздействие на образование на стенке сосудов обогащенных макрофагами атеросклеротических бляшек, связанных с процессами воспаления,

и снижение в связи с этим кровоснабжения сердечной мышцы. Само проявление патологии сердечно-сосудистой системы после облучения имеет большой лаг-период, особенно после получения низких доз [38].

Обнаружено, что в 1987 году после аварии на Чернобыльской АЭС мальчиков в Баварии и Дании родилось больше, чем девочек [39]. Смертность новорожденных существенно возросла в 1987–1988 годах [40].

Молодые люди, получившие дозы ионизирующего излучения *in utero*, имели существенно более низкий IQ, чем контрольная группа того же возраста. Различия ограничиваются вербальным IQ, но не выражены по невербальному IQ. Эти эффекты отсутствовали в группе лиц, получивших облучение после 16 нед. внутриутробного развития [41].

Нами определены частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови и костного мозга различных лабораторных и диких видов мелких мышевидных грызунов, воспроизводимых в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС (ЧАЭС). Эта зона является уникальной модельной системой для изучения популяционно-генетических преобразований, вызванных изменением направления и интенсивности естественного отбора. После катастрофы на ограниченной территории произошло резкое изменение целого комплекса экологических факторов, и на фоне этих изменений обитают представители различных таксономических групп, в том числе высшие млекопитающие. Важно еще и то, что известен главный компонент запуска этой экологической катастрофы – выброс радионуклидов. Следует подчеркнуть, что в лабораторных условиях невозможно моделирование действия сетевых, взаимосвязанных изменений множества условий воспроизводства популяции под действием даже одного фактора экологического стресса (например, повышения радионуклидного загрязнения), а в полевых условиях, как правило, невозможен семейный анализ наследования индуцированных изменений в поколениях.

Для того чтобы оценить возможное направление популяционно-генетических изменений под влиянием увеличения ионизирующего облучения в зоне отчуждения ЧАЭС с учетом генетической гетерогенности биоиндикаторных видов в полевых условиях, в настоящей работе выполнен сравнительный анализ долговременных изменений как в поколениях генетически гомогенной лабораторной линии мышей СС57W/Mv, так и у видов полевок, отловленных в 1994–2001 годах в зоне отчуждения ЧАЭС, в местах с различными уровнями радионуклидного загрязнения. Цитогенетическую изменчивость в поколениях

генетически гомогенной популяции анализировали с использованием созданных в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины двух популяций мышей линии СС57W/Mv – чернобыльской (специвиарий в 10-километровой зоне влияния ЧАЭС) и контрольной (виварий в г. Киеве). Эти популяции были любезно предоставлены академиком НАНУ С.С. Малютой. Анализировали клетки костного мозга мышей первого и второго поколения киевской популяции (К-1, К-2) и первого, второго, пятого, седьмого и десятого поколений чернобыльской популяции (Ч-1, Ч-2, Ч-5, Ч-7 и Ч-10), воспроизводимых в специвиарии при расчетной поглощенной дозе излучения около 0.6 Гр на животное.

Определены мутационные спектры у представителей видов полевок (*Microtus arvalis* и *Clethrionomys glareolus*), отловленных в зоне отчуждения ЧАЭС в местах с низким уровнем радионуклидного загрязнения ( $< 5 \text{ Ки/км}^2$ ), которые рассматривали как спонтанные (условно контрольные), в условиях промежуточного уровня радионуклидного загрязнения ( $\sim 200 \text{ Ки/км}^2$  – Янов, расчетная поглощенная доза – около 0.6–0.8 Гр/год) и при высоких уровнях ( $500\text{--}1000 \text{ Ки/км}^2$ , оз. Глубокое, Чистогаловка, «Рыжий лес», расчетная поглощенная доза – около 0.9–1.1 Гр/год).

В клетках костного мозга животных учитывали следующие цитогенетические характеристики: два типа анеуплоидии, полиплоидию, частоту встречаемости метафаз с хромосомными aberrациями (ХА), с центромерными слияниями по типу Робертсоновских транслокаций (РБ) и с асинхронностью расщепления центромерных районов хромосом в конце метафазы (АРЦР). Процент анеуплоидных клеток рассчитывался в двух вариантах – клетки с утратой или приобретением хромосом, больше чем одна (общая анеуплоидия, А1), а также анеуплоидные клетки с числом хромосом  $2n \pm 1$  (А2). Количество двуядерных лейкоцитов (ДЯ) и лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ) подсчитывали на тех же препаратах в клетках с сохраненной цитоплазмой. Митотический индекс (МИ), частоты встречаемости ДЯ, ЛМЯ рассчитывали на 1000 клеток.

У мышей линии СС57W/Mv обнаружено существенное увеличение частот цитогенетических аномалий в мутационных спектрах чернобыльской популяции (в частности, метафаз с хромосомными aberrациями:  $0.9 \pm 0.2\%$  в контроле и  $6.0 \pm 2.0\%$  в экспериментальной популяции). В то же время ответ на один и тот же уровень повышенного ионизирующего излучения статистически значимо отличался в группах линейных мышей разного возраста (табл. 1, 2), а также в поколениях экспериментальной популяции (табл. 3).

**Таблица 1.** Частота встречаемости микроядер в 1000 эритроцитов (ЭМЯ) периферической крови мышей линий СС57W/Mv разного возраста из черновыльської и киевской популяций в разные сезоны

Сезон	ЭМЯ, контроль, ‰		ЭМЯ, Чернобыль, ‰	
	2.5–3.5 мес.	14–16 мес.	2.5–3.5 мес.	14–16 мес.
Зима 1993	2.5 ± 0.7	2.7 ± 0.9	10.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0
Лето 1994	3.0 ± 0.8	3.2 ± 0.7	6.5 ± 1.0	3.8 ± 0.3

**Таблица 2.** Частоты клеточных делений и цитогенетических аномалий у «молодых» и «старых» мышей линии СС57W/Mv в контроле (Киев) и в Чернобыле

Группа мышей	Возраст, мес.	МИ, ‰	ДЯ, ‰	ЛМЯ, ‰
«Молодые» контрольные мыши (Киев)	2–3	6.8 ± 0.5***	4.5 ± 0.7	5.2 ± 0.3**
«Молодые» экспериментальные мыши (Чернобыль)	2–3	5.6 ± 0.7	9.0 ± 1.4*	14.4 ± 2.4**
«Старые» контрольные мыши (Киев)	12–18	3.5 ± 0.6***	7.1 ± 1.3	10.5 ± 1.3*
«Старые» экспериментальные мыши (Чернобыль)	12–18	7.0 ± 1.0*	5.0 ± 0.8*	6.0 ± 0.8*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

*Примечание.* Здесь и в табл. 3 и 4 МИ – количество метафаз на 1000 клеток, ДЯ – количество двуядерных лейкоцитов на 1000 клеток, ЛМЯ – количество моноядерных лейкоцитов с микроядрами на 1000 клеток.

По данным, представленным в *табл. 1*, видно, что частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами в контрольных группах «молодых» и «старых» животных, определенные в разные сезоны, не имеют статистически значимых различий. Однако у черновыльских «молодых» животных этот показатель оказался существенно выше, чем в контрольной популяции и у «старых» животных. Результаты этих исследований (*табл. 1*) позволяют предположить, что возрастные изменения сопровождаются уменьшением чувствительности эритробластов к повреждающим воздействиям. Можно ожидать, что в данном случае у «старых» животных протекают процессы физиологической адаптации к более длительному действию хронического низкодозового облучения по сравнению с «молодыми». Обнаружено, что процессы такой физиологической адаптации сопровождаются увеличением количества делящихся клеток и определенным ускорением клеточного цикла, если судить по количеству двуядерных лейкоцитов на один митоз в клетках костного мозга групп «старых» контрольных и черновыльских животных (*табл. 2*).

Анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках костного мозга «молодых» мышей линии СС57W/Mv в последовательных поколениях (Ч-1, Ч-2, Ч-5, Ч-7, Ч-10), воспроизводящихся

в условиях хронического воздействия повышенного ионизирующего облучения, позволил обнаружить нелинейность изменений ряда цитогенетических характеристик в поколениях генетически однородных животных (*табл. 3*). Оказалось, что частота таких цитогенетических характеристик, как РБ, ХА, АРЦР, связанных непосредственно с внутрихромосомными повреждениями, снижается к пятому поколению, повышается к седьмому и опять снижается – к 10-му поколению. Сходный рисунок изменчивости в поколениях отмечен и в случае доли анеуплоидных клеток второго типа ( $2n = 40 \pm 1$  хромосома). Частоты встречаемости цитогенетических аномалий остальных типов повышены только у черновыльских мышей первого поколения по сравнению с контрольными популяциями (*табл. 3*).

Нелинейная изменчивость в поколениях генетически однородных мышей, определяемая по встречаемости клеток с внутрихромосомными дефектами, может свидетельствовать о том, что интенсивность повреждений, вызванных длительным воздействием ионизирующего излучения в низкодозовом диапазоне, сопоставима с активностью процессов репарации таких повреждений, элиминации поврежденных клеток, а также со скоростью размножения замещающих, неповрежденных клеточных клонов. Полифакторность механизмов физиологической адаптации

**Таблица 3.** Изменчивость цитогенетических характеристик у мышей линии СС57W/Мv в поколениях (Ч-1, Ч-2, Ч-5, Ч-7, Ч-10), воспроизводимых в условиях специфического варианта ЧАЭС по сравнению с контрольными популяциями К-1 и К-2 (средние значения)

Поколения	Анеуплоиды, %		Полиплоиды, %	Частота встречаемости метафаз, %			Количество на 1000 клеток, ‰		
	A1	A2	ПП	РБ	ХА	АРЦР	МИ	ДЯ	ЛМЯ
К-1	23 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3	6.0 ± 0.7	6.0 ± 0.6	6.0 ± 0.7
К-2	27 ± 5	10 ± 1	4 ± 1	9 ± 3	2.0 ± 0.1	2.0 ± 1.0	7.0 ± 0.6	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.4
Ч-1	30 ± 2	12 ± 1	4 ± 2	11 ± 3	6.0 ± 2.0	5.0 ± 1.0	7.0 ± 1.0	10.0 ± 1.5	14.0 ± 2.0
Ч-2	28 ± 3	5 ± 3	9 ± 2	8 ± 2	6.0 ± 3.0	7.0 ± 1.0	7.0 ± 1.0	5.0 ± 0.9	6.0 ± 1.0
Ч-5	34 ± 5	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	0.5 ± 0.2	1.0 ± 1.0	8.0 ± 1.0	7.0 ± 0.4	6.0 ± 0.4
Ч-7	35 ± 2	7 ± 1	2 ± 1	8 ± 1	4.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0	7.0 ± 0.7	8.0 ± 1.0	5.0 ± 2.0
Ч-10	20 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	1.0 ± 0.2	4.5 ± 1.0	2.5 ± 0.4	6.0 ± 0.7	7.0 ± 1.0	5.0 ± 0.4

*Примечание.* Здесь и в табл. 4 А1 – общая анеуплоидия; А2 – анеуплоидия  $2n \pm 1$  хромосома; ПП – доля полиплоидных клеток; РБ – доля клеток с центрическими слияниями хромосом по типу Робертсоновских транслокаций; ХА – частота метафаз с хромосомными aberrациями; АРЦР – доля клеток с асинхронностью расщепления центромерных районов хромосом в конце метафазы.

**Таблица 4.** Частоты встречаемости различных цитогенетических аномалий в клетках костного мозга у особей рыжей полевки, отловленных в местах с разным уровнем радионуклидного загрязнения

Частота встречаемости метафаз, %						Количество на 1000 клеток костного мозга, ‰		
A1	A2	РБ	ПП	АРЦР	ХА	МИ	ДЯ	ЛМЯ
Контроль								
33.7 ± 6.0	9.0 ± 3.5	14.0 ± 3.5	0.5 ± 0.5	6.2 ± 3.6	1.2 ± 0.7	3.2 ± 0.6	3.5 ± 0.6	5.5 ± 1.5
Общее Янов за 1997–1999 годы								
31.2 ± 2.4	8.9 ± 3.7	13.9 ± 6.0	6.9 ± 5.6	10.1 ± 4.1	8.1 ± 4.0	5.7 ± 1.0	5.2 ± 0.8	3.2 ± 0.8
«Рыжий лес» 1999 год								
34.6 ± 6.2	10.5 ± 3.0	22.6 ± 3.6	1.2 ± 0.7	9.6 ± 1.3	3.5 ± 0.8	5.2 ± 1.2	3.7 ± 1.1	6.5 ± 0.7
«Рыжий лес» 2001 год								
35.2 ± 2.8	6.3 ± 1.1	12.9 ± 3.1	0.5 ± 0.4	11.8 ± 2.8	0.9 ± 0.3	8.0 ± 2.5	9.8 ± 1.7	8.0 ± 1.2

животных к ионизирующему излучению, сопоставимость интенсивности действия разнонаправленных факторов могут приводить к последовательному повышению и понижению частоты встречаемости цитогенетических аномалий на фоне относительно постоянного уровня действия повреждающего агента у генетически однородных животных.

Анализ генетически гетерогенных популяций полевок, отловленных в разные годы в местах с разным уровнем радионуклидного загрязнения, позво-

лил получить данные о том, что в популяциях рыжей и обыкновенной полевки, обитающих в местах с высоким уровнем радионуклидного загрязнения, к 1999 и 2001 годам отчетливо выражена селекция животных с повышенной радиорезистентностью (табл. 4 и 5).

Так, в популяциях рыжей полевки, отловленных в 1999 и 2001 годах в местах с максимально высоким уровнем радионуклидного загрязнения, обнаружены в основном животные, в клетках костного мозга кото-

**Таблица 5.** Частоты встречаемости различных цитогенетических аномалий в клетках костного мозга у особей обыкновенной полевки, отловленных в местах с разным уровнем радионуклидного загрязнения

Частота встречаемости метафаз, %						На 1000 одноядерных лимфоцитов, ‰		
A1	A2	ПП	РБ	ХА	АРЦР	МИ	ДЯ	ЛМЯ
Контроль								
44.4 ± 5.1	8.6 ± 0.8	0.9 ± 0.5	1.0 ± 0.5	2.5 ± 0.6	16.5 ± 4.9	4.5 ± 0.9	5.0 ± 0.8	3.0 ± 0.4
2001 год, Чистоголовка, оз. Глубокое, ~500 Ки/км <sup>2</sup>								
26.5 ± 2.7	3.1 ± 0.8	1.8 ± 0.4	0.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3	17.6 ± 4.1	6.1 ± 0.6	7.8 ± 1.6	3.1 ± 0.5

рых частота встречаемости цитогенетических аномалий не только не больше, чем в условно контрольной популяции, но по отдельным характеристикам даже меньше (табл. 4). Видно, что повышение количества радиоустойчивых особей рыжей полевки наиболее выражено в популяции «Рыжего леса» (1000 Ки/км<sup>2</sup>). В местах с существенно меньшим уровнем радионуклидного загрязнения (Янов, ~200 Ки/км<sup>2</sup>) такая селекция не наблюдалась.

Похожие данные получены и при исследовании популяций обыкновенной полевки (табл. 5).

Таким образом, в генетически гетерогенных популяциях двух видов полевок, отловленных в местах с высоким уровнем радионуклидного загрязнения, наблюдается накопление предположительно радиорезистентных особей в поколениях, как и у генетически однородной лабораторной линии мышей, а также снижение частоты встречаемости некоторых типов цитогенетических аномалий ниже типичных для контрольных популяций.

По-видимому, источники таких нелинейных ответов на ионизирующее излучение в низкодозовом диапазоне могут быть многочисленными, реализовываться на разных этапах действия ионизирующего излучения и на разных уровнях организации многоклеточных организмов. Так, сложный каскад биохимических событий может запускаться в результате индукции ионизирующим излучением свободнорадикальных процессов в клетке [42]. Накопление свободных радикалов приводит к активации антиоксидантных ферментов, ограничивающих свободнорадикальные процессы, к которым относятся супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза [43]. Активация этих ферментов может быть специфичной для отдельных тканей и клеточных органелл. Обнаружено, например, что изменение антиоксидантной активности митохондрий прямо связано со стабильностью хромосомного аппарата клеток. У мышей с дефектом

митохондриальной супероксиддисмутазы в клетках костного мозга появляются типичные «лучевые» маркеры – робертсоновские транслокации, дицентрики, кольцевые хромосомы [44]. Описано повышение радиоустойчивости хромосом человека при увеличении активности теломеразы [45] и ее снижение при нарушении белков хроматина, которые препятствуют реализации двухцепочечных разрывов ДНК в мутации [46]. Показано существование «субстратной» индукции процессов репарации ДНК: оказалось, что большое количество двухцепочечных разрывов ДНК, которые образуются после облучения фибробластов человека в дозе 2 Гр, репарируется много быстрее, чем немногочисленные разрывы, возникшие после облучения в дозе 200 мГр [47]. Можно ожидать также, что определенный вклад в нелинейные ответы многоклеточных организмов на одну и ту же дозу ионизирующего излучения могут вносить и межклеточные взаимодействия, такие, как изменение соотношений между высокоспециализированными и низкокодифференцированными клеточными популяциями. У млекопитающих вклад в такой ответ может вносить и соотношение между эффекторными клетками иммунной системы, которые отличаются по радиочувствительности, а также представленность на плазматической мембране поврежденных клеток антигенных структур, опознаваемых киллерными клетками [48].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в поколениях генетически однородных и генетически гетерогенных популяций мелких мышевидных грызунов частоты встречаемости некоторых типов цитогенетических аномалий изменяются нелинейно на фоне длительного воздействия низких доз ионизирующего излучения. Можно ожидать, что подобная нелинейность обусловлена множественностью и разнонаправленностью имеющихся и индуцируемых излучением репарационных процессов на клеточном и субклеточном уровнях, а также со-

поставимого с ними по интенсивности повреждающего действия экзогенного фактора. По-видимому, нелинейность эффектов исчезает только тогда, когда интенсивность повреждающего действия ионизирующего излучения существенно превышает возможности полифакторных механизмов адаптации.

В наших экспериментах на трех разных лабораторных линиях мышей (чернобыльские популяции – спецвиварий в 10-километровой зоне влияния ЧАЭС; контрольные – виварий в г. Киеве) установлено, что в контрольных условиях каждая линия имеет свой спектр спонтанных мутаций в клетках костного мозга, и только некоторые характеристики этого спектра меняются в связи с возрастом и сезоном исследования [49]. Так, для мышей C57BL/6 типично нарастание анеуплоидии (хромосомных потерь) с возрастом и при переходе к летнему сезону. У мышей линии CC57W/Mv возрастные и сезонные изменения были связаны преимущественно с внутрихромосомными дефектами (хромосомными абберациями), а у мышей BALB/c с долей полиплоидных клеток. В условиях повышенного уровня ионизирующего излучения в спецвиварии около Чернобыльской АЭС (поглощенные дозы около 0.5–0.6 Гр/год) наблюдалось повышение частот встречаемости только тех аномалий, спонтанная нестабильность которых обнаруживалась в контрольных условиях. Например, в линии C57BL/6 увеличивалась частота анеуплоидных клеток, в линии CC57W/Mv – метафаз с хромосомными абберациями. Таким образом, в данном случае повышение ионизирующего излучения не приводило к появлению новых характеристик в мутационных спектрах мышей, а только усиливало спонтанную нестабильность отдельных, специфичных для линий, характеристик таких спектров.

Оказалось, что у полевок, отловленных в местах с повышенным уровнем радионуклидного загрязнения, наблюдается та же тенденция. В клетках костного мозга накапливаются именно те цитогенетические аномалии, повышенная изменчивость которых видоспецифична и для полевок, обитающих в относительно чистых местах: для рыжей полевки – метафаз с робертсоновскими межхромосомными слияниями, для обыкновенной полевки – анеуплоидов. Полученные данные позволяют предполагать, что повышение уровня ионизирующего излучения (в пределах, исследованных нами) у лабораторных линий мышей и у полевок только увеличивает частоту встречаемости цитогенетических аномалий, которые отличаются повышенной изменчивостью, специфичной для линии (у мышей) и вида в контрольных условиях. Сложность анализа таких мутационных спектров еще более возрастает, поскольку у исследованных животных наблюдается

выраженная предрасположенность индивидуальных хромосом к возникновению цитогенетических аномалий определенного типа.

Проведен также сравнительный анализ частот встречаемости различных хромосомных поломок в клетках крови детей 14–15 лет. В одну группу вошли дети, получившие ионизирующее излучение в дозе около 30 мЗв в период эмбрионального развития, вторая группа состояла из детей, получивших приблизительно такую же дозу, но в течение всей жизни, поскольку жили в загрязненных радионуклидами местностях (около 1.5 мЗв/год) [50, 51]. Оказалось, что в этих двух группах детей частоты встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями были практически одинаковыми, однако, в первой группе (острое облучение в эмбриональном периоде) статистически значимо повышено число клеток со стабильными хромосомными аномалиями, такими, как транслокации, инверсии, инсерции. Полученные данные свидетельствуют о том, что в крови детей накапливаются клоны клеток с перечисленными аномалиями. Поскольку известен определенный параллелизм между частотой мутационных событий в популяциях соматических и генеративных клеток, а также то, что именно эти типы цитогенетических аномалий могут существенно осложнять прохождение мейоза, можно ожидать, что у детей, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения в эмбриональном периоде, будут возникать проблемы с репродуктивной функцией [50, 51].

Интересно отметить, что тенденция к увеличению чувствительности к ионизирующему излучению в связи с усложнением организма известна достаточно давно, т.е. чем древнее вид, тем он более устойчив к ионизирующему облучению. У млекопитающих средняя полулетальная доза ионизирующего излучения достигает 4–6 Гр, у кишечной палочки (*Escherichia coli*) – 30 Гр. Рекордсменом в этом отношении является бактерия *D. radiodurans*, отдельные клетки которой выживают и способны к воспроизводству после облучения в 5000 Гр [23]. Причем обнаружено, что сразу после облучения дозой в 3000 Гр практически вся геномная ДНК этого организма разрушена до небольших фрагментов, в среднем индуцируется один двухцепочечный разрыв ДНК на участок длиной в 27 т.п.н., а уже через 3 ч после воздействия геном начинает восстанавливаться без существенного накопления мутаций в структурных генах. В данном случае наблюдается не уникальная устойчивость генетического материала к ионизирующему облучению, а видоспецифичная способность к восстановлению его целостности. Обнаружено, что подобная способность к репарации повреждений ДНК ассоциирована у этого вида с генами засухоустойчивости;

мутации в которых приводят к исчезновению уникальной радиоустойчивости этого вида.

Считается, что увеличение точности («разрешения») генетических методов оценки повреждений хромосом при низкодозовых воздействиях позволит более точно выявить взаимосвязь между малыми дозами излучения и индуцируемыми ими мутационными событиями. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о появлении новых мутаций у детей облученных родителей в высокополиморфных последовательностях ДНК [52, 53]. Однако в работе Вейнбер и др. [52] с использованием RAPD-ПЦР-маркеров (Random Amplification of Polymorphic DNA), но не ISSR-ПЦР-маркеров (Inter Simple Sequence Repeats) получены данные о возникновении новых мутаций у детей ликвидаторов. В работе Дубровы и др. [53] установлено повышение частоты мутаций в трех из восьми исследованных минисателлитных локусов у детей, родители которых проживали в зонах повышенного радионуклидного загрязнения. То есть результаты анализа мутационных событий, обусловленных низкодозовыми воздействиями, зависели от использованных ДНК-маркеров (RAPD-ПЦР, но не ISSR-ПЦР) и от исследуемых локусов. Из этого следует, что при помощи существующих методов выявления мутационных событий непосредственно в ДНК принципиально не удается получить однозначных данных о генетических эффектах малых доз ионизирующего излучения, которые не зависели бы от способа анализа и особенностей изменчивости отдельных локусов.

Попытки оценить генетические последствия воздействий экотоксических факторов предпринимаются достаточно давно, и в этом развитии можно выделить два основных направления. Одно – это поиск молекулярно-генетических систем, связанных с детоксикацией и ферментами антиоксидантной защиты, второе – популяционно-генетические исследования динамики аллельных вариантов генетических систем, ассоциированных с устойчивостью к таким факторам.

Биомаркеры метаболизма ксенобиотиков принято подразделять на гены, продукты которых участвуют в метаболической активации промутагенов (проканцерогенов) с появлением короткоживущих высокотоксичных производных (в частности, гены цитохромов P450), и гены, продукты которых контролируют их детоксикацию, например, глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы. В последнее время в связи с использованием ПЦР удалось обнаружить прямые связи между генетически детерминированным полиморфизмом таких ферментов и чувствительностью к индукции рядом ксенобиотиков цитогенетических аномалий, нарушений ре-

продуктивной функции и развития некоторых типов опухолей у человека [54–56].

Второе направление развивается менее успешно, оно основано на изучении изменений структуры популяций, попадающих под действие экологического стресса, по распределению аллельных вариантов и генотипов структурных генов и анонимных (в отношении функции) высокополиморфных ДНК, участие которых в формировании чувствительности к генотоксическим агентам не установлено.

К настоящему времени обнаружены ассоциации между устойчивостью людей к ионизирующему излучению и наличием определенных генотипов в основном по локусам трансферрина и гаптоглобина [57, 58]. Японскими исследователями описана также повышенная частота встречаемости определенных генотипов по генам комплекса гистосовместимости у долгожителей «хибакуси» (переживших атомную бомбардировку Нагасаки и Хиросимы), что связывают с определенным статусом иммунной системы, способствующим повышенной устойчивости к ряду распространенных заболеваний [59].

Успех в поиске биомаркеров устойчивости к генотоксичным воздействиям во многом зависит от качества и адекватности моделей, используемых для изучения популяционно-генетических последствий экологических стрессов.

Очевидно, что глубину, направление и особенности популяционно-генетических последствий действия факторов экологического стресса можно оценить только в ряду поколений организмов, обитающих в условиях воздействия таких факторов.

Выявление генов и генных ансамблей, наследование которых предпочтительно и ассоциировано с отбором на устойчивость к новым условиям среды, может привести к разработке индивидуальных, так называемых «генетических паспортов» устойчивости к физическому и химическому загрязнению окружающей среды. Такие данные позволят контролировать популяционно-генетическую структуру вида и способствовать ее изменению в желательных направлениях.

В наших работах, подробно освещенных в монографии [49], выполненных на разных видах млекопитающих с использованием генетико-биохимических, молекулярно-генетических, цитогенетических методов получены следующие основные данные.

У ряда сельскохозяйственных видов животных под влиянием повышенного ионизирующего излучения (поглощенная доза – 0.6–0.8 Гр/год) происходит сдвиг спектров органоспецифических изоферментов, в основном, в тканях почек и сердца, причем в сердце начинает экспрессироваться ряд изоферментов, типичных для менее специализированной мышечной

ткани. В популяционных исследованиях разных видов млекопитающих не выявлено существенного увеличения числа особей с конститутивными мутациями. В поколениях крупного рогатого скота, получивших поглощенные дозы около 0.8 Гр/год (по цезию 137), обнаружено: а) снижение плодовитости и повышение смертности новорожденных телят; б) нарушение равновероятного наследования отдельных аллельных вариантов – элиминация одних и преимущественное наследование других; в) смещение генетической структуры родительского поколения, типичной для молочного скота, в сторону менее специализированных форм; г) изменение генетической структуры, совпадающее с популяционно-генетическими эффектами таких биотических и абиотических факторов стресса, как отбор на устойчивость к инфицированию вирусом лейкоза крупного рогатого скота, интродукция в новые условия воспроизводства. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что главный ответ на длительное воздействие низкодозового ионизирующего излучения заключается не в индукции появления новых генов, а в предпочтительном отборе в поколениях новых генных сочетаний. То есть, как это и соответствует положениям эволюционной теории, развитым в свое время И.И. Шмальгаузенем [60], изменение условий отбора приводит к предпочтительному воспроизводству наименее специализированных форм, что и наблюдается в поколениях крупного рогатого скота в условиях действия разных факторов экологического стресса.

Для изучения особенностей генетической структуры групп животных использовали как традиционные биохимические и молекулярно-генетические маркеры, позволяющие проанализировать полиморфизм по ряду локусов, кодирующих белки крови, так и маркеры интронной области гена лептина и экзона 4 гена к-казеина, фрагментов ДНК, фланкированных микросателлитными локусами (ISSR-ПЦР-маркеры). Оценили также информативность привлечения дополнительных характеристик генетической структуры пород – анализа закономерностей межлокусных ассоциаций генов [61]. Исследуемые локусы входили в различные группы сцепления [62]. Рассмотрены две группы синтенных генов (генов трансферрина и церулоплазмينا – хромосома 1; рецептора витамина D, к-казеина и гемоглобина – хромосома 6) и четыре несинтенных гена (ген амилазы-1 – хромосома 3, лептина – хромосома 4, пури-нуклеозидфосфорилазы – хромосома 10 и посттрансферрина-2 – хромосома 19).

В результате изучения генетической структуры в ряду поколений крупного рогатого скота, разводимого в условиях повышенного радионуклидного загрязнения – в зоне отчуждения Чернобыльской

АЭС, получены следующие данные. Только во втором поколении выявлено одно животное с мутацией в локусе трансферрина. Отмечено нарушение равновероятной передачи аллельных вариантов некоторых локусов от родителей к потомкам, а также изменение результатов оценки неравновесия по сцеплению ряда локусов. Показано, что в условиях повышенного радионуклидного загрязнения гетерозиготность в поколениях не уменьшается, несмотря на близкородственные скрещивания. Таким образом, на этой модели впервые установлен факт популяционно-генетических изменений у животных в условиях экологического стресса, а также показано, что такие изменения направлены в сторону преимущественного воспроизводства гетерозигот как по структурным генам, так и по «анонимным» участкам ДНК (ISSR-ПЦР-маркерам).

Далее мы сопоставили популяционно-генетические последствия не только повышенного уровня ионизирующего излучения, но и других биотических и абиотических факторов экологического стресса на генетическую структуру, оцениваемую с использованием различных молекулярно-генетических маркеров, внутривидовых групп разных пород крупного рогатого скота. Рассматривали следующие варианты действия экологических факторов. У породы красная степная в анализ вошли две группы животных, отличающиеся по устойчивости к действию фактора биотического стресса (инфицированные вирусом бычьего лейкоза и свободные от него) – из хозяйств Херсонской обл., относительно «чистой» в отношении техногенного загрязнения; и из хозяйств Кировограда и Донецка, для которых характерно повышенное химическое загрязнение (абиотический фактор). У породы пинцгау рассматривали три группы в связи с воспроизводством в равнинных, горных и высокогорных условиях (абиотический фактор). Серую украинскую породу представляли две группы – из Херсонской обл. (исходное местообитание) и из Алтайского края и Сибири (новые условия – абиотический фактор). У голштинской породы действие абиотического фактора выясняли, сравнивая генетическую структуру двух групп, одна из которых воспроизводилась в хозяйстве относительно чистой Херсонской области, другая (экспериментальное стадо) – в хозяйстве «Новошепеличи», в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС (радионуклидное загрязнение около 200 Ки/км<sup>2</sup>, абиотический фактор). Популяционно-генетические исследования проводили с использованием различных маркеров, таких, как электрофоретические варианты белков, полиморфизм сайтов рестрикции, ISSR-ПЦР-маркеры.

Установлено, что влияние факторов экологического стресса может приводить к существенной генети-

ческой дифференциации групп животных, в некоторых случаях превышающей межпородные отличия. Выявлены два гена, кодирующие рецептор витамина D и пурин-нуклеозидфосфорилазу, выраженные отличия в частотах встречаемости аллелей которых обнаружены у групп крупного рогатого скота одной породы, находящихся в условиях разного экологического стресса (химическое загрязнение, интродукция в новые условия воспроизводства, инфицированность вирусом лейкоза крупного рогатого скота). Это позволяет предполагать существование универсальных характеристик популяционно-генетического ответа пород крупного рогатого скота на влияние разных факторов экологического стресса [63].

Анализ репродуктивных особенностей экспериментального стада крупного рогатого скота позволяет выяснить механизмы, благодаря которым у потомков родителей, подвергавшихся действию экотоксических факторов, изменяется генетическая структура и происходит удаление ряда аллелей и генотипов, ассоциированных с повышенной чувствительностью. Так, экспериментальное стадо, подвергавшееся действию повышенного уровня ионизирующего излучения (поглощенная доза – 0.8–1.1 Гр/год) включало родительское поколение (F0), состоящее из трех коров (Альфа, Бета, Гамма) и быка Урана, отловленных в 1987 году недалеко от ЧАЭС, а также из 13 коров, завезенных в 1990 и 1993 годах в хозяйство «Новошепеличи» (Припять) из относительно «чистых» зон. Коровы поколения F0 (всего 16) экспериментального стада, рожденные в «чистой» зоне, суммарно дали 96 телят ( $0.93 \pm 0.03$  теленка на корову в год), 20 из которых (21%) не дожили до 3 месяцев после рождения. Первое поколение (F1), родившееся в условиях экспериментального хозяйства «Новошепеличи», существенно отличалось от родительского по этому показателю. Так, из 36 коров F1 стерильными были 21 (58%), и только 15 принесли потомство (поколение F2,  $0.73 \pm 0.06$ ), причем 13 телят из них умерли, не достигнув 3-месячного возраста (26%). Четыре коровы F2 родили всего 10 телят (F3) за 2–4 года, т.е.  $0.94 \pm 0.06$  теленка от коровы в год. Обращает на себя внимание и тот факт, что среди 20 погибших телят F1 преобладали бычки (шесть телок и 14 бычков), а среди 13 погибших телят F2 соотношение полов было приблизительно одинаковым (семь телок и шесть бычков).

Таким образом, изменения в генетической структуре потомства, полученного от родителей, подвергавшихся воздействию экотоксических факторов, объясняются уменьшением рождаемости и повышением смертности новорожденных – носителей аллельных вариантов, ассоциированных с повышенной чувствительностью к данному фактору.

## ПОСЛЕДСТВИЯ ПРОЖИВАНИЯ В РАДИОАКТИВНЫХ ПРОВИНЦИЯХ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

В разных районах земли имеется множество «радиоактивных» провинций, и в ряде из них к настоящему времени определены различные популяционно-генетические характеристики населения. Так, проведены широкие исследования населения, живущего в местностях с повышенным радиоактивным фоном (штат Карела в Индии, провинция Гуанфонт в Китае), где облученность населения за год составляет от 0.6 до 10 сГр. В результате не выявлено повышения уровня наследственных заболеваний населения [64, 65]. Обследование более 40000 беременных женщин, проживающих в местностях с повышенным радиоактивным фоном в Бразилии, не выявило повышения частоты спонтанных аборт и врожденных аномалий, хотя частота хромосомных aberrаций в клетках крови жителей тех же районов была несколько выше, чем в контрольных районах [66].

Наиболее известна провинция Рамзар в Иране, годовая поглощенная доза в которой равна 260 мЗв, при среднемировой дозе 3.5 мЗв/год. При этом у жителей Рамзара не обнаружено ни увеличения смертности, ни рождения детей с врожденными дефектами развития.

В то же время наблюдаются отчетливые отличия по радиорезистентности клеток крови жителей этой провинции по сравнению с жителями областей с низким естественным радиоактивным фоном. Так, облучение культуры клеток периферической крови жителей Рамзара дозой в 1.5 Гр приводило к существенно меньшему увеличению клеток с цитогенетическими аномалиями по сравнению с клетками крови контрольной группы [67].

Опубликованные к настоящему времени результаты исследования популяций жителей «радиоактивных» провинций свидетельствуют о том, что в таких местах из поколения в поколение идет отбор на повышение радиорезистентности. Так, в Китае за период 1979–1995 годов обследовано 125079 жителей «радиоактивной» провинции, проанализировано 10415 смертей и 1003 онкологических заболеваний. Обнаружено, что смертность от онкологических заболеваний в «радиоактивной» провинции была ниже, чем у жителей контрольной зоны [68]. В другой работе авторы пришли к выводу, что превышение уровня ионизирующего излучения в 3–5 раз не повышает вероятность возникновения онкологических заболеваний [69].

Не обнаружено существенных отличий по наличию врожденных патологий у новорожденных (26151) из «радиоактивной» провинции в Индии (около 35.0 мЗв/год) и у новорожденных (10654) из контрольной группы [70]. Обследование жителей другой «радиоактивной» провинции (выше 70 мЗв/год) Ин-

дии (400000 человек, 100000 из которых проживали в «радиоактивной» части провинции) не выявило отличий в частотах онкологических заболеваний в связи с высоким уровнем внешнего  $\gamma$ -облучения [71].

В популяциях из областей Индии, отличающихся на 0.03 мЗв/год внешнего облучения, ежегодное выявление онкологических заболеваний в расчете на 100000 человек последовательно уменьшается от одной области к другой параллельно с увеличением фонового уровня ионизирующего излучения на 0.03 мЗв/год – от гипотетической частоты онкологических заболеваний, равной 79 : 100000 человек, в условиях «нулевого» уровня внешнего облучения. Авторы приходят к выводу, что с ростом ионизирующего излучения уменьшается вероятность развития онкологических заболеваний [72].

Необходимо подчеркнуть, что среди 116000 человек, отселенных из Чернобыльской зоны, только около 5% получили дозу ионизирующего излучения более 100 мЗв/год, и именно эта доза (почти в 3 раза меньшая, чем в Рамзаре) считается тем пределом, после которого отчетливо возрастают частоты онкологических заболеваний [73].

Таким образом, реальную опасность представляет не сама полученная доза ионизирующего облучения, а ее «новизна» для данной популяции, вида или видовых сообществ. Очевидно, что у жителей Рамзара увеличение годовой дозы на 3.5 мЗв вряд ли будет приводить к каким-либо последствиям для здоровья, но в большинстве европейских популяций, не встречавшихся в ряду поколений с дозами выше 1 мЗв/год, такое изменение может привести к уходу из генофонда радиочувствительных особей и соответственно к изменению генетической структуры популяций.

Таким образом, в естественных условиях существует широкий диапазон доз ионизирующего облучения, с которыми совместимы жизнедеятельность и воспроизводство различных организмов, в частности человека. Это затрудняет выявление биологических эффектов малых доз, в том числе и генотоксичности.

#### **ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ХРОНИЧЕСКОГО НИЗКОДОЗОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ У РАЗНЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ЛАБОРАТОРНЫЕ ЛИНИИ МЫШЕЙ, ПОЛЕВКИ, КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ**

Наши собственные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в условиях хронического действия повышенного уровня ионизирующего излучения число мутантных особей у исследованных видов не увеличивается. Повышение частоты соматических клеток с цитогенетическими аномалиями

не сопровождалось качественными изменениями по сравнению со спонтанными мутационными спектрами, поскольку возрастали только те показатели нестабильности хромосомного аппарата, которые имели генотипические особенности у линий мышей и видовые у полевок.

Сравнительный анализ мутационных спектров у полевок, проведенный в разные годы, показал, что со временем, несмотря на сохранение высокого уровня радиоактивного загрязнения в местах отлова, количество особей разных видов с высокой частотой мутантных клеток в костном мозге постепенно уменьшалось. У обыкновенной полевки и у рыжей полевки в 1996 году частота встречаемости животных с высокими уровнями цитогенетических аномалий была существенно выше, чем в относительно «чистых» зонах, и у животных, отловленных в тех же местах, но в более поздние годы, в 1999 и в 2001. Так, метафазы с хромосомными абберациями у обыкновенной полевки встречались в контроле с частотой  $2.5 \pm 1.5\%$ , а в Чистогаловке в 1996 и в 1999 годах –  $3.6 \pm 0.8$  и  $5.0 \pm 2.3$ , в 2001 году – с частотой  $2.5 \pm 0.3\%$ . У рыжей полевки в контроле таких метафаз было  $1.2 \pm 0.7\%$ , в «Рыжем лесу» в 1996 году –  $7.3 \pm 3.4$ , в 1999 году –  $3.5 \pm 0.8$  и в 2001 году там же –  $0.9 \pm 0.3\%$  метафаз.

Важно подчеркнуть, что такое уменьшение, свидетельствующее о постепенном накоплении радиорезистентных особей, в случае рыжей полевки отчетливо наблюдается только у животных, отловленных в «Рыжем лесу» с очень высоким уровнем радионуклидного загрязнения ( $> 1000$  Ки/км<sup>2</sup>), в отличие от животных, обитающих в местах с более низким уровнем радионуклидного загрязнения (Янов,  $\sim 200$  Ки/км<sup>2</sup>). Таким образом, скорость отбора на радиорезистентность тем выше, чем выше уровень радионуклидного загрязнения. Обращает на себя внимание и то, что даже в участках зоны отчуждения с таким высоким уровнем радионуклидного загрязнения, как «Рыжий лес», накопление радиорезистентных особей обнаружено только в 1999 году, т.е. через 13 лет после чернобыльской аварии, после того как сменилось 26 поколений полевок (полевки размножаются 2 раза в год).

Интересно отметить, что сходные данные о селекции устойчивых особей на фоне неблагоприятных экологических условий получены нами для разных сельскохозяйственных видов, воспроизводящихся в условиях биосферного заповедника (Хубсугул, Монголия) и в зоне рискованного животноводства в южной части пустыни Гоби [74]. Проведен сравнительный анализ частот встречаемости эритроцитов с микроядрами в образцах крови местных монгольских пород крупного рогатого скота, овец, а также яков, воспроизводящихся в разных эколого-географических

условиях: северо-запад Монголии, район Хубсугул, биосферный заповедник; юг Монголии, район, примыкающий к пустыне Гоби – зона рискованного животноводства. Количество эритроцитов с микроядрами рассчитывали в 3000 клеток и выражали в промилле (‰). Частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами оказались близкими у разных видов, воспроизводящихся в одних и тех же экологических условиях, но существенно отличались от животных из разных эколого-географических регионов. Так, в районе биосферного заповедника с условиями, благоприятными для разведения, частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами оказались существенно выше, чем у животных тех же видов в зоне рискованного животноводства. В районе Хубсугул у овец (22) частота эритроцитов с микроядрами была  $5.3 \pm 0.4\%$ ; у крупного рогатого скота (7) –  $4.6 \pm 0.7\%$ ; у яков (7) –  $3.2 \pm 0.6\%$ ; в пустыне Гоби у овец (10) –  $0.9 \pm 0.1\%$ ; у крупного рогатого скота (7) –  $1.8 \pm 0.6\%$ ; у яков (7) –  $0.3 \pm 0.2\%$ . Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное действие факторов экологического стресса высокой интенсивности способствует отбору животных (в ряду поколений) с повышенной устойчивостью генетического аппарата к неблагоприятным средовым условиям.

В поколениях экспериментального стада «Новошепеличи» черно-пестрого голштиinizированного крупного рогатого скота наблюдается нарушение равновероятной передачи аллельных вариантов ряда молекулярно-генетических маркеров и рост гетерозиготности. В родительском поколении частота встречаемости лейкоцитов с микроядрами оказалась статистически значимо выше ( $P < 0.05$ ), чем в первом, втором и третьем поколениях животных, рожденных в зоне повышенного радионуклидного загрязнения, однако, эта характеристика и в третьем поколении оказалась значимо ниже ( $P < 0.01$ ), чем во втором. Частота встречаемости в мазках периферической крови двуядерных лейкоцитов также достоверно выше в родительском поколении, чем в первом и во втором поколениях животных. То есть радиорезистентность животных, родившихся в условиях повышенного ионизирующего излучения, возрастает в ряду поколений, о чем свидетельствует частота цитогенетических аномалий в мазках периферической крови. Не выявлено носителей робертсоновских транслокаций, которые нередко находят в «чистых» зонах у представителей видов с акроцентрическими аутосомами.

Сравнительный анализ по комплексу молекулярно-генетических маркеров экспериментального стада с черно-пестрым голштиinizированным скотом из относительно «чистых» зон разведения, а также с представителями древней примитивной породы, ссрой украинской, позволил увидеть сближение гене-

тической структуры животных экспериментального стада, родившихся в условиях повышенного уровня радионуклидного облучения, с генофондом этой древней породы, в отличие от родительской группы особей. Такой сдвиг генетической структуры генофонда экспериментального стада «Новошепеличи», исходно принадлежащего специализированной молочной породе, в сторону более примитивной породы наблюдался по аллельным вариантам структурных генов и по фрагментам ДНК, фланкированным инвертированными микросателлитными повторами. Можно ожидать, что такие изменения являются универсальным популяционно-генетическим ответом крупного рогатого скота на действие разных факторов экологического стресса.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общими для полученных нами и опубликованных данных являются следующие. Главная проблема для популяций разных видов, в том числе и человека, проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами после аварии на Чернобыльской АЭС, заключается не в абсолютной величине доз ионизирующего облучения, а в новизне для них этих доз. Главные генетические последствия для популяций разных видов заключаются не в увеличении количества мутантных организмов, а в том, что часть генов уходит из их воспроизводства, вследствие селекции против «радиочувствительных» организмов. То есть не появляются новые гены, а уходят «старые», связанные с повышенной «чувствительностью» организмов к новым условиям воспроизводства. Имеются косвенные данные, согласно которым более приспособленными к новым условиям внутри вида оказываются наименее специализированные особи.

Такая «реверсия» к более примитивным, онтогенетически и эволюционно более ранним формам наблюдается на разных уровнях организации биологического материала: сдвиг органоспецифичных изоферментных спектров к онтогенетически более ранним вариантам; смещение популяционно-генетической структуры в поколениях к преобладанию менее специализированных форм; облучение *in utero* привело у молодых людей к снижению IQ только вербального варианта [41], эволюционно более позднего приобретения у человека по сравнению с невербальным IQ, основанным на более древних структурах. Реальные генетические последствия чернобыльской катастрофы для популяций человека будут известны еще не скоро, поскольку только сейчас дети, родившиеся после 1986 года, вступают в репродуктивный период.

Интересно отметить, что в настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что перво-

очередное разрушение эволюционно самых молодых биологических систем является достаточно общим биологическим правилом [75].

Накопленные данные позволяют сформулировать четыре основных закона Чернобыля, которые, по нашему мнению, могут оказаться универсальными для последствий всех глубоких экологических изменений, связанных с природными и техногенными катастрофами и кризисами. Эти законы следующие: 1) после Чернобыля рождаются не все, кто должен был бы родиться; 2) после Чернобыля идет отбор против специализированных форм и преимущественное воспроизводство менее специализированных, но обладающих более высокой устойчивостью к дей-

ствию неблагоприятных средовых факторов; 3) ответ на одни и те же дозы ионизирующего облучения зависит от ее «новизны» для популяции, предшествующего отбора у предковых поколений на устойчивость к таким дозам; 4) реальные последствия чернобыльской аварии для популяций человека будут доступны для анализа не ранее чем через 20 лет, поскольку поколение, попавшее под прямое повреждающее воздействие аварии, только в последние годы вступило в репродуктивный период. Следует обратить внимание на то, что увеличение частоты встречаемости даже патологии щитовидной железы вследствие чернобыльской аварии снижает вероятность репродуктивного успеха у ее носителей. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гилева Э.А., Большаков В.Н., Косарева Н.Л., Габитова А.Т. Частота хромосомных нарушений у синантропных домашних мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнения среды // ДАН. 1992. Т. 325. С. 1058–1061.
2. Гилева Э.А. Эколого-генетический мониторинг с помощью грызунов (уральский опыт). Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 1997. 105 с.
3. Дмитриев С.Г. // Экология. 1997. № 6. С. 447–451.
4. Дмитриев С.Г. // Генетика. 1997. Т. 33. № 11. С. 1589–1592.
5. Крюков В.Н., Толстой В.А., Долгопалова Г.В., Каневская К.Т. // Экология. 1995. № 2. С. 169–171.
6. Wood R.D., Mitchell M., Lindahl T. // Mutat. Res. 2005. V. 577. P. 275–283.
7. Ciciarello M., Lavia P. // EMBO Repts. 2005. V. 6. № 8. P. 714–716.
8. Farina A.R., Tacconelli A., Cappabianca L. // Mol. Cell. Biol. 2009. V. 29. № 17. P. 4812–4830.
9. Ame J.-C., Fouquerel E., Laurent R., Gauthier L.R. // J. Cell Sci. 2009. V. 122. № 12. P. 1990–2002.
10. Gisselsson D., Hakanson U., Stoller P. // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 4. e1871.
11. Schoeftner S., Blasco M.A. // Semin. Cell Devel. Biol. 2010. V. 21. P. 186–193.
12. Begus-Nahrman Y., Hartmann D., Kraus J. // J. Clin Invest. 2012. V. 122. № 6. P. 2283–2288.
13. Greaves M., Maley C.C. // Nature. 2012. V. 481. № 7381. P. 287–294.
14. Schuster-Bockler B., Lehner B. // Nature. 2012. V. 488. № 7412. P. 504–507.
15. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. // Genetics. 1998. V. 148. P. 1667–1686.
16. Roach J.C., Glusman G., Smit A.F.A. // Science. 2010. V. 328. P. 636–639.
17. Marnett L.J., Plastaras J.P. // Trends Genet. 2001. V. 17. № 4. P. 214–221.
18. Memisoglu A., Samson L. // Mutat. Res. 2000. V. 451. P. 39–51.
19. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B., Chiang S.Y., Kow Y.W., Swenberg J.A. // Cancer Res. 1998. V. 58. № 2. P. 222–225.
20. Nair J., Carmichael P.L., Fernando R.C., Phillips D.H., Strain A.J., Bartsch H. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1998. V. 7. № 5. P. 435–440.
21. Nair J., Furstenberger G., Burger F., Marks F., Bartsch H. // Chem. Res. Toxicol. 2000. V. 13. № 8. P. 703–709.
22. Haber J.E. // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 271–275.
23. Battista J.R., Earl A.M., Park M.-J. // Trends Microbiol. 1999. V. 7. № 9. P. 362–365.
24. Ильинских Н.Н. // Генетика. 1988. Т. 24. № 3. С. 156–162.
25. Столина М.Р., Глазко Т.Т., Соломко А.П., Малюта С.С., Глазко В.И. // Докл. НАН Украины. 1993. № 6. С. 93–98.
26. Mousseau T.A., Nelson N., Shestopalov V. // Nature. 2005. V. 437. P. 1089.
27. Гилева Э.А., Любашевский М.Н., Стариченко В.И., Чибиряк М.В., Романов Г.Н. // Генетика. 1996. Т. 32. № 1. С. 114–119.
28. Пилинская М.А. // Межд. журн. радиационной мед. 1999. № 2. С. 60–66.
29. Богданов И.М., Сорокина М.А., Маслюк А.И. // Бюлл. сибирской медицины. 2005. № 2. С. 145–151.
30. Busby C., Lengfelder E., Pflugbeil S., Schmitz-Feuerhake I. // Med. Confl. Surviv. 2009. V. 25. № 1. P. 20–40.
31. Little M.P. // J. Radiol. Prot. 2009. V. 29. № 2A. P. A43–59.
32. Little M.P. // Mutat. Res. 2010. V. 687. № 1–2. P. 17–27.
33. Busby C.C. // Int. J. Environ. Res. Publ. Hlth. 2009. V. 6. P. 3105–3114.
34. Noshchenko A.G., Bondar O.Y., Drozdova V.D. // Int. J. Cancer. 2010. V. 127. P. 412–426.
35. Cardis E., Krewski D., Boniolet M. // Int. J. Cancer. 2006. V. 119. P. 1224–1235.
36. Liaginskaia A.M., Tukov A.R., Osipov V.A., Ermalitskiĭ A.P., Prokhorova O.N. // Radiats Biol. Radioecol. 2009. V. 49. № 6. P. 694–702.
37. Лазюк Г.И., Зацепин И.О., Кравчук Ж.П., Хмель Р.Д. Радиационный мониторинг жителей и их продуктов питания в Чернобыльской зоне Беларуси. Минск: Информ. бюлл. 2003. № 24. С. 41–42.
38. Hildebrandt G. // Mutat. Res. 2010. V. 687. № 1–2. P. 73–77.
39. Scherb H., Voigt R. // Environmetrics. 2009. V. 20. P. 596–606.
40. Scherb H., Weigelt E. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2003. Special Issue 1. P. 117–125.
41. Heiervang K.S., Mednick S., Sundet K., Rund B.R. // Scand. J. Psychol. 2010. V. 51. № 3. P. 210–215.
42. Kale R.K. // Ind. J. Exp. Biol. 2003. V. 41. № 2. P. 105–111.
43. Lee H.C., Kim D.W., Jung K.Y. // Int. J. Mol. Med. 2004. V. 13. № 6. P. 883–887.
44. Samper E., Nicholls D.G., Melov S. // Aging Cell. 2003. V. 2. P. 277–285.
45. Pirzio L.M., Freulet-Marriere M.A., Bai Y. // Cytogenet.

- Genome Res. 2004. V. 104. № 1–4. P. 87–94.
46. Gutierrez-Enriquez S., Fernet M., Dork T. // *Genes Chromosomes Cancer*. 2004. V. 40. № 2. P. 109–119.
47. Rothkamm K., Lobrich M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 9. P. 5057–5062.
48. Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., Raulet D.H. // *Nature*. 2005. V. 436. № 7054. P. 1186–1190.
49. Глазко Т.Т., Архипов Н.П., Глазко В.И. Популяционно-генетические последствия экологических катастроф на примере чернобыльской аварии. М.: ФГОУ ВПО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2008. 556 с.
50. Настюкова В.В., Степанова Е.И., Глазко В.И. // *Докл. НАН Украины*. 2002. № 11. С. 178–183.
51. Настюкова В.В., Степанова Е.И., Глазко В.И. // *Цитология и генетика*. 2002. Т. 6. С. 45–52.
52. Вейнберг Г.Ш., Король А., Нево Е., Шапиро С., Реннерт Г. // *Межд. журн. радиационной мед.* 1999. Т. 2. № 2. С. 67–70.
53. Дуброва Ю.Е., Пламб М., Браун Дж., Джеффрейз А.Дж. // *Межд. журн. радиационной мед.* 1999. Т. 1. № 1. С. 90–100.
54. Pluth J.M., Nelson D.O., Ramsey M.J., Tucker J.D. // *Pharmacogenetics*. 2000. V. 10. № 4. P. 311–319.
55. Zusterzeel P.L., Nelen W.L., Roelofs H.M. // *Mol. Hum. Reprod.* 2000. V. 6. № 5. P. 474–478.
56. Schwartz J.L. // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000. V. 11. № 1. P. 92–122.
57. Beckman L., Nordenson I. // *Hum. Hered.* 1988. V. 38. № 1. P. 56–58.
58. Тельнов В.И., Вологодская И.А., Жунтова Г.В. // *Генетика*. 1995. Т. 31. № 5. С. 715–721.
59. Hayashi T., Kusunoki Y., Seyama T. // *Health Phys.* 1997. V. 73. № 5. P. 779–786.
60. Шмальгаузен И.И. Избранные труды: Пути и закономерности эволюционного процесса. М.: Наука, 1983. 360 с.
61. Garnier-Gere P., Dillmann C. // *J. Heredity*. 1992. V. 83. № 3. P. 239.
62. Eggen E., Fries R. // *Animal Genet.* 1995. V. 26. P. 215–236.
63. Глазко В.И. // *Изв. ТСХА*. 2007. Вып. 5. С. 142–148.
64. Gopal A.A. // *Ind. J. Exp. Biol.* 1970. № 8. P. 313–318.
65. Luxin W. // *J. Radiat. Res.* 1981. V. 22. № 1. P. 88–100.
66. Freire-Maja N. // *Ciência e Cultura*. 1977. V. 30. № 2. P. 385–395.
67. Ghiassi-Nejad M., Mortazavi S.M., Cameron J.R., Niroomand-rad A., Karam P.A. // *Health Phys.* 2002. V. 82. № 1. P. 87–93.
68. Tao Z., Zha Y., Akiba S. // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 2000. V. 41. Suppl. P. 31–41.
69. Zhang W., Wang C., Chen D. // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 2003. V. 44. № 1. P. 69–74.
70. Jaikrishan G., Andrews V.J., Thampi M.V. // *Radiat. Res.* 1999. V. 152. Suppl. 6. S 149–153.
71. Nair M.K., Nambi K.S., Amma N.S. // *Radiat. Res.* 1999. V. 152. Suppl. 6. S 145–148.
72. Nambi K.S., Soman S.D. // *Health Phys.* 1987. V. 52. № 5. P. 653–657.
73. Masse R. // *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*. 2000. Ser. III. V. 323. № 7. P. 633–640.
74. Glazko T.T., Stolpovsky Yu.A. Genetically and environment components of micronuclei test. In: *Book of Abstracts of XXIVth Genetic Days, Brno, Czech Republic, 1–3 September, 2010. Brno, State University of Gregor Mendel's name, 2010.* P. 20.
75. Sansom R.S., Gabbott S.E., Purnell M.A. // *Proc. R. Soc. B.* 2010. e-publishing: [rspb.royalsocietypublishing.org](http://rspb.royalsocietypublishing.org).

УДК 578.282

# Структурно-функциональный анализ 2,1,3-бензоксадиазолов и их N-оксидов в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1

С. П. Королев<sup>1,2\*</sup>, О. В. Кондрашина<sup>1,2</sup>, Д. С. Дружиловский<sup>3</sup>, А. М. Старосотников<sup>4</sup>, М. Д. Дутов<sup>4</sup>, М. А. Бастраков<sup>4</sup>, И. Л. Далингер<sup>4</sup>, Д. А. Филимонов<sup>3</sup>, С. А. Шевелев<sup>4</sup>, В. В. Поройков<sup>3</sup>, Ю. Ю. Агапкина<sup>1,2</sup>, М. Б. Готтих<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

<sup>4</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47  
\*E-mail: spkorolev@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2012

**РЕФЕРАТ** Интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) считается одной из самых привлекательных мишеней для разработки ингибиторов этого вируса. В настоящей работе изучена способность ряда отобранных с использованием компьютерной программы PASS 2,1,3-бензоксадиазолов (бензофуразанов) и их N-оксидов (бензофуруксанов) подавлять каталитическую активность интегразы ВИЧ-1. Установлено, что ингибирующая способность этих соединений сильно зависит от наличия нитрогруппы. Показано, что нитробензофуразаны и нитробензофуруксаны препятствуют связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента. Эти ингибиторы оказались активными и в отношении мутантов интегразы, устойчивых к действию ралтегравира – единственного разрешенного к клиническому применению ингибитора интегразы. Сравнение полученных с использованием компьютерных программ фармакодинамических и фармакокинетических характеристик исследованных в данной работе соединений и ралтегравира свидетельствует о перспективности дальнейшего их изучения в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** интегразы ВИЧ-1, ингибирование, нитробензофуруксан, нитробензофуразан, PASS, QikProp.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БФЗ – бензофуразан; БФКС – бензофуруксан; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интегразы; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ADME – адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция; IC<sub>50</sub> – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; IC<sub>95</sub> – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 95%; PASS – компьютерная программа для предсказания спектра активностей веществ; QikProp – компьютерная программа для предсказания фармакокинетических параметров веществ.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает одно из наиболее опасных заболеваний – синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Очень высокие темпы роста числа ВИЧ-инфицированных в России делают разработку эффективных лекарственных средств для борьбы с этим вирусом особенно актуальной для нашей страны. Одной из перспективных мишеней для ингибиторов ВИЧ-1 считается фермент интегразы (ИН), которая катализирует ключевую стадию в репликативном цикле ВИЧ – интеграцию вирусной ДНК в клеточную [1].

При ВИЧ-инфекции применяют высокоактивную антиретровирусную терапию, включающую в настоящий момент 25 препаратов [2], основными из которых являются ингибиторы двух вирусных ферментов: обратной транскриптазы и протеазы. В конце 2007 года разрешен к применению в качестве нового средства против СПИДа первый ингибитор ИН – препарат Isentress™, или ралтегравир [3]. Однако даже комплексная терапия не способна полностью подавить репликацию вируса, и с течением времени вирус становится устойчивым к ней. Так показано, что устойчивость к ралтегравирu развивается у некоторых па-

циентов в течение 12 нед. [4]. На стадии клинических испытаний находятся в основном только ингибиторы ИН, близкие к ралтегравире по механизму действия [5]. Уже показано, что к ним возникает устойчивость, перекрестная с ралтегравиром [6]. В связи с этим разработка новых ингибиторов интеграции, отличных по механизму действия от ралтегравира, представляет актуальную задачу.

В последние годы для поиска новых физиологически активных веществ и их оптимизации широко применяются методы компьютерного конструирования [7]. В частности, компьютерные методы используются при создании ингибиторов ИН ВИЧ-1 [8–10]. При помощи разработанной нами компьютерной программы PASS [11, 12] проведены виртуальный скрининг и отбор возможных ингибиторов ИН среди коммерчески доступных и потенциально синтезируемых соединений [13, 14], а с использованием специализированной версии программы PASS [14] отобраны производные 2,1,3-бензоксадиазолов (бензофуразанов) и их N-оксидов (бензофуроксанов). Эти соединения были синтезированы, и в настоящей работе экспериментально изучена их способность подавлять каталитическую активность ИН ВИЧ-1.

В ходе репликации вируса ИН катализирует две реакции: реакцию 3'-концевого процессинга вирусной ДНК, в результате которого с обоих 3'-концов удаляется динуклеотид GT; и реакцию переноса цепи, в ходе которой вирусная ДНК встраивается в клеточную. Ралтегравир и его аналоги называются ингибиторами переноса цепи, поскольку более эффективно подавляют именно эту реакцию [15]. Мы обнаружили, что бензофуразаны (БФЗ) и бензофуроксаны (БФКС) в основном одинаково влияют на обе катализируемые ИН реакции. Показано, что ингибирующая способность этих соединений сильно зависит от присутствия нитрогруппы. В серии замещенных 4-нитро-БФЗ/БФКС найдены соединения, в концентрации 0.5–1 мкМ блокирующие ИН. Эти ингибиторы оказались активными и в отношении мутантных ИН, устойчивых к действию ралтегравира.

Проведена оценка фармакодинамических и фармакокинетических характеристик БФЗ и БФКС, полученных с использованием компьютерных программ PASS и QikProp [16], показаны потенциальные преимущества этих соединений перед ралтегравиром.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Компьютерные программы и базы данных

Специализированную версию компьютерной программы PASS, обученную на основе выборки из 218 соединений с изученной способностью подавлять ИН, использовали для виртуального скрининга и от-

бора в базах данных коммерчески доступных образцов и потенциально синтезируемых соединений, веществ, с высокой вероятностью ингибирующих ИН ВИЧ-1 [14]. Из них 35 действуют на 3'-процессинг ( $IC_{50} < 100$  мкМ), 28 ингибируют реакцию переноса цепи ( $IC_{50} < 100$  мкМ), остальные не обладают рассматриваемой активностью. Общий фармакологический профиль новых ингибиторов ИН оценивали с использованием современной стандартной версии программы PASS (12.06.22) [11, 12], позволяющей предсказать 513 возможных побочных и токсических эффектов. Результат выдается пользователю в виде упорядоченного списка возможных видов биологической активности с оценками  $P_a$  и  $P_i$ , характеризующими вероятность присутствия/отсутствия каждой активности соответственно.

Для оценки фармакокинетических параметров ADME анализируемых молекул использовали программу QikProp [16], которая обеспечивает расчет физико-химических характеристик лекарственного подобия. Эта программа широко применяется для отсеивания соединений с заведомо неперспективными фармакокинетическими характеристиками [17–19]. Рекомендуемый для перспективных соединений диапазон значений параметров, оцениваемых программой QikProp, приведен в работе [14].

### 1,2,5-Бензоксадиазолы (бензофуразаны) и их N-оксиды (бензофуроксаны)

1,2,5-Бензоксадиазолы и их N-оксиды синтезировали по известным [20–22] или аналогичным методикам.

### Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3400 («Applied Biosystems», США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов («Glen Research», США). Олигонуклеотиды U5B (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCACAC-3') формировали дуплекс, имитирующий концевой участок U5-фрагмента длинного концевого повтора вирусной ДНК, который служит субстратом ИН в реакции 3'-процессинга. Дуплекс олигонуклеотидов U5B-2 (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCA-3') и U5A использовали в реакции переноса цепи. Влияние ингибиторов на правильную укладку ДНК в активном центре ИН изучали с использованием дуплекса U5B/U5A<sup>m</sup> (5'-ACT<sup>m</sup>GCTAGAGATTTTCACAC-3'), где T<sup>m</sup> – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)-уридин, синтезированный по методике [23]. Олигонуклеотиды N155H (5'-CTGTCCTATAATTTTCTTTAATTCTTTATGCATAGATTCTATTACCCCTGA-3'), G140S

(5'-GGGGATCAAGCAGGAATTTAGCATTCCTAC-AATC-3'), Q148K (5'-GCATTCCTACAAATCCSSAA-AGTAAGGGGGTAATAG-3') и комплементарные им N155H\_a, G140S\_a и Q148K\_a использовали в качестве праймеров для сайт-направленного мутагенеза гена интегразы ВИЧ-1 с целью получения генов мутантных форм интегразы (N155H, G140S/Q148K).

### Ферменты

Рекомбинантную ИН ВИЧ-1 выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta *Escherichia coli* и очищали без добавления детергента как описано в [24]. Плазмиды, содержащие гены мутантных форм ИН (замены N155H и G140S/Q148H), получены при помощи сайт-направленного мутагенеза плазмиды, кодирующей ИН дикого типа, с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit («Agilent Technologies», США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Мутантные белки выделяли и очищали аналогично ИН ВИЧ-1 дикого типа [24].

### Получение <sup>32</sup>P-меченного субстрата интегразы

Радиоактивную метку <sup>32</sup>P вводили на 5'-конец олигонуклеотида U5B или U5B-2. С этой целью 10 пмоль олигонуклеотида инкубировали с T4-полинуклеотидкиназой («Fermentas», Литва) и 50 мкКи [γ-<sup>32</sup>P]АТР (3000 Ки/ммоль) в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°C. После этого киназу инактивировали, добавляя EDTA (25 мМ) и нагревая до 65°C в течение 10 мин. Добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида U5A и формировали дуплекс нагреванием смеси олигонуклеотидов до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Дуплекс U5B/U5A окончательно очищали от избытка [γ-<sup>32</sup>P]АТР и солей на колонке MicroSpin G-25 Columns («Amersham Biosciences», США).

### Ингибирование реакции 3'-концевого процессинга

<sup>32</sup>P-меченный дуплекс U5B/U5A (3 нМ) инкубировали с ИН (100 нМ) в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ) в присутствии ингибитора в возрастающих концентрациях при 37°C в течение 2 ч. Реакцию останавливали 80 мкл стоп-раствора (7 мМ EDTA, 0.3 М NaOAc, 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0.125 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт = 25 : 24 : 1, ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофоретически в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Гель анализировали при помощи прибора STORM 840™

Phosphorimager («Molecular Dynamics», США). О протекании реакции судили по появлению на геле полосы, соответствующей по подвижности олигонуклеотиду U5B, укороченному на два звена. Эффективность реакции оценивали при помощи программы Image QuANT™ 4.1. По результатам трех независимых опытов строили кривую зависимости эффективности протекания 3'-процессинга от концентрации ингибитора. По кривой определяли значение IC<sub>50</sub> как концентрацию ингибитора, при которой реакция подавляется на 50%.

### Ингибирование реакции переноса цепи

Реакцию проводили как в случае ингибирования 3'-процессинга, используя <sup>32</sup>P-меченный дуплекс U5B-2/U5A (10 нМ) и ИН (100 нМ). О протекании реакции судили по появлению в геле полос с меньшей подвижностью, чем у исходного олигонуклеотида U5B-2.

### Метод «торможения» в геле

<sup>32</sup>P-меченный дуплекс U5B/U5A (0.05 пмоль) инкубировали с интегразой (2 пмоль) в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин, при 20°C в течение 30 мин. К пресформированному фермент-субстратному комплексу добавляли возрастающие количества олигонуклеотидного ингибитора (0.01–10.0 мкМ), смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, а затем наносили на 8% ПААГ (соотношение акриламид-бисакриламид = 40 : 1), не содержащий мочевины. Буфер для электрофореза содержал 20 мМ Трис-ацетат, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Гель анализировали с помощью прибора STORM 840™ Phosphorimager.

### Влияние ингибитора на правильную укладку ДНК в активном центре ИН

Непосредственно перед опытом 2,3-дигидроксипропильную группировку в составе олигонуклеотидного дуплекса окисляли до альдегидной группы: к 10 пмоль дуплекса U5B/U5A<sup>m</sup>, содержащего <sup>32</sup>P-меченный модифицированный олигонуклеотид U5A<sup>m</sup> в 15 мкл 30 мМ ацетата натрия (рН 4.5), добавляли 15 мкл свежеприготовленного 230 мМ водного раствора периодата натрия. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 25°C в темноте. Затем добавляли 170 мкл 2 М водного раствора перхлората лития, олигонуклеотидный материал осаждали 1 мл ацетона. Полученный дуплекс U5B/U5A<sup>m</sup>, содержащий олигонуклеотид с 2'-альдегидной группой (U5A<sup>m</sup>), растворяли в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ. Ковалентное присоединение окисленного дуплекса U5B/U5A<sup>m</sup> (10 нМ) к ИН (100 нМ) проводили в 20 мкл буфера,

содержащего 20 мМ HEPES, pH 7.2, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, в присутствии возрастающих концентраций ингибитора в течение 1 ч при 37°C. Затем продукт реакции восстанавливали, добавляя 2 мкл 300 мМ свежеприготовленного раствора NaBH<sub>3</sub>CN и инкубируя в течение 30 мин при 37°C. Реакционную смесь анализировали в ПААГ по Лэммли. Меченые продукты визуализировали с помощью прибора STORM 840™ Phosphorimager. Эффективность протекания реакции оценивали по интенсивности полосы, соответствующей ковалентно связанному комплексу ИН с ДНК, с помощью программы Image QuaNT™ 4.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Виртуальный скрининг новых ингибиторов интегразы

Для виртуального скрининга и отбора веществ, с высокой вероятностью являющихся ингибиторами ИН ВИЧ-1, использовали специализированную версию программы PASS [14]. Точность прогноза антиинтегразной активности, посчитанная для обучающей выборки из 218 веществ по методу скользящего контроля с исключением по одному, составила 81%. При помощи данной версии PASS получен прогноз биологической активности ралтегравира, который эффективно ингибирует реакцию переноса цепи (табл. 1). Рассчитанная вероятность наличия данной активности у ралтегравира (Pa) составила 0.948. Все это говорит о значительной способности программы PASS предсказывать антиинтегразную активность соединений.

Было проанализировано более 2 млн структурных формул веществ, принадлежащих к различным химическим классам. Среди отобранных на основе компьютерного прогноза структур оказались производные бензофуразанов и бензофуроксанов. Для проведения структурно-функциональных исследований синтезированы 27 различных соединений (табл. 1), входящих в эти структурные классы, у которых рассчитанная вероятность наличия способности ингибировать реакции 3'-процессинга и переноса цепи была больше 0.5.

### Влияние структуры 1,2,5-бензоксадиазолов на их способность подавлять активность ИН

Способность БФЗ и БФКС подавлять каталитическую активность ИН изучена в реакциях 3'-концевого процессинга и переноса цепи с использованием рекомбинантного белка и ДНК-дуплексов U5B/U5A и U5B-2/U5A, соответствующих концевому участку вирусной ДНК до и после отщепления динуклеотида GT. Дуплекс U5B/U5A представлял собой субстрат ИН в реакции 3'-концевого процессинга, а дуплекс

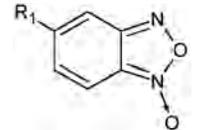
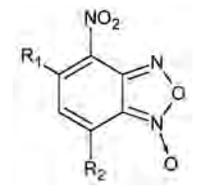
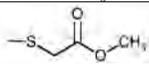
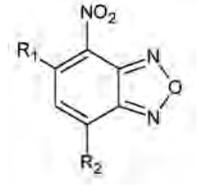
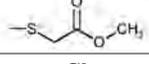
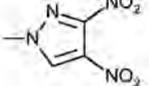
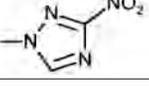
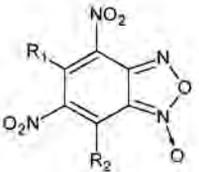
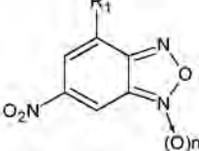
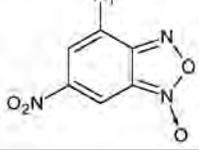
U5B-2/U5A – в реакции переноса цепи. Необходимо отметить, что рекомбинантная ИН может использовать любую ДНК в качестве мишени для встраивания процессированного субстрата в реакции переноса цепи, поэтому дуплекс U5B-2/U5A служил одновременно и субстратом, и мишенью в этой реакции.

Незамещенный БФКС не проявлял ингибирующего действия ни в одной из реакций (табл. 1, соединение 1). Введение электронодонорного (метил) или электроноакцепторного (хлор) заместителей в 5-е положение лишь незначительно улучшало ингибирующую активность БФКС в реакции переноса цепи (табл. 1, 2 и 3). Однако 4-нитро-БФКС оказался значительно более эффективным ингибитором обеих реакций (табл. 1, 4).

Учитывая такое сильное влияние нитрогруппы, мы изучили влияние заместителей в положениях 5 и 7 на активность 4-нитро-БФКС. Оказалось, что наличие метильного остатка в любом из этих положений значительно повышало ингибирующую активность 4-нитро-БФКС (табл. 1, 5 и 6). При этом присутствие метильной группы в обоих положениях не давало дополнительного положительного эффекта, а наоборот несколько снижало эффективность ингибирования (табл. 1, 7). Усиление ингибирующей активности 4-нитро-БФКС в результате введения метильной группы в положение 5 или 7 можно было бы объяснить электронодонорным эффектом метильной группы. Для подтверждения или опровержения этого предположения определили эффективность ингибирования процессинга и переноса цепи производными 4-нитро-БФКС, содержащими в положении 7 другие электронодонорные заместители (табл. 1, 8 и 9). Оказалось, что оба эти соединения блокируют ИН с эффективностью, сравнимой с эффективностью незамещенного 4-нитро-БФКС. Таким образом, положительный индуктивный эффект метильной группы не может быть причиной повышенной ингибирующей активности соединений 5 и 6. Маловероятной причиной является и возможность гидрофобных взаимодействий метильной группы с белком, поскольку метоксигруппа теоретически также способна к таким взаимодействиям. Интересно, что производное 4-нитро-БФКС, содержащее электроноакцепторный заместитель – хлор в положении 7, оказалось более активным ингибитором, чем исходный 4-нитро-БФКС (табл. 1, 10), но уступало 7-метил-4-нитро-БФКС.

Далее мы определили, насколько важна роль N-оксида. С этой целью сравнили ингибирующее действие производных 4-нитро-БФКС и соответствующих производных 4-нитро-БФЗ. Незамещенный 4-нитро-БФЗ ингибировал обе исследуемые реакции несколько лучше, чем его N-оксид (табл. 1, 11 и 4), однако его метильные производные (соеди-

Таблица 1. Способность производных БФЗ и БФКС подавлять каталитическую активность ИН в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи

Структура	№	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ингибирующая активность, IC <sub>50</sub> , мкМ*	
				3'-процессинг	перенос цепи
Ралтегравир				0.50 ± 0.09	0.010 ± 0.003
	1	H	-	> 1000	> 1000
	2	CH <sub>3</sub>	-	> 1000	800 ± 200
	3	Cl	-	> 1000	500 ± 200
	4	H	H	80 ± 20	80 ± 30
	5	CH <sub>3</sub>	H	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3
	6	H	CH <sub>3</sub>	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	7	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1.0 ± 0.3	7 ± 2
	8	H	OCH <sub>3</sub>	70 ± 20	80 ± 20
	9	H		50 ± 10	80 ± 30
	10	H	Cl	20 ± 5	50 ± 10
	11	H	H	30 ± 5	40 ± 10
	12	CH <sub>3</sub>	H	2.0 ± 0.4	3.0 ± 0.6
	13	H	CH <sub>3</sub>	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.5
	14	OCH <sub>3</sub>	H	75 ± 12	150 ± 40
	15	H	OCH <sub>3</sub>	80 ± 30	120 ± 20
	16	H		65 ± 11	70 ± 20
	17	H	Cl	10 ± 2	45 ± 12
	18	H	-SO <sub>2</sub> -Ph	20 ± 5	15 ± 5
	19	H		10 ± 2	12 ± 3
	20	H		18 ± 6	20 ± 5
	21	H	H	400 ± 100	500 ± 120
	22	H	CH <sub>3</sub>	2.0 ± 0.4	0.3 ± 0.1
	23	H	CH <sub>2</sub> Br	6 ± 2	2.0 ± 0.5
	24	H	 Cl	75 ± 15	80 ± 20
	25	H	-	0.5 ± 0.1	5 ± 2
	26	H	-	6 ± 1	5 ± 1
	27	OCH <sub>3</sub>	-	100 ± 20	100 ± 30

\*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

Таблица 2. Ингибирование каталитической активности мутантных форм ИН, устойчивых к ралтегравир, производными нитро-БФКС/БФЗ

Соединение, №	Ингибирующая активность в реакции переноса цепи, IC, мкМ*					
	дикий тип		мутант Q148K/G140S		мутант N155H	
	IC <sub>50</sub>	IC <sub>95</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>95</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>95</sub>
Ралтегравир	0.010 ± 0.003	0.40 ± 0.05	0.15 ± 0.03	3.0 ± 1.0	0.018 ± 0.005	5.2 ± 0.8
<b>6</b>	0.4 ± 0.2	3.5 ± 0.9	0.8 ± 0.3	4.3 ± 0.8	0.9 ± 0.3	8.2 ± 1.7
<b>22</b>	0.3 ± 0.1	6.8 ± 1.1	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.1	7.6 ± 1.3
<b>25</b>	5.0 ± 2.0	18.0 ± 2.0	4.0 ± 1.5	15.3 ± 2.8	6.0 ± 1.8	18.8 ± 2.5

\*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

нения **12** и **13**) оказались в 3–6 раз менее активны, чем соединения **5** и **6** (табл. 1). Тем не менее в серии производных 4-нитро-БФЗ в целом сохранялись закономерности, обнаруженные нами для производных 4-нитро-БФКС (табл. 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что производные 4-нитро-БФЗ и соответствующие N-оксиды способны блокировать ИН ВИЧ-1 со сравнимой эффективностью, величина которой зависит от характера заместителей в положении 5 или 7; наиболее эффективными ингибиторами оказались метилзамещенные 4-нитро-БФЗ и 4-нитро-БФКС.

Помимо БФКС, содержащих одну нитрогруппу, в качестве блокаторов ИН были испытаны также производные 4,6-динитро-БФКС (табл. 1, **21–24**). Оказалось, что введение второй нитрогруппы существенно снижает ингибирующую активность (ср. **21** и **4**). Однако присутствие метильного заместителя в положении 7 и в случае 4,6-динитро-БФКС значительно повысило эффективность ингибирования интеграции, причем перенос цепи подавлялся в 6–7 раз лучше, чем 3'-процессинг (табл. 1, **22**). Интересно, что соединение **23**, содержащее электроноакцепторный бромметильный заместитель, также эффективно ингибировало обе реакции, хотя и несколько уступало 7-метил-4,6-динитро-БФКС (**22**). В то же время соединение **24**, содержащее в положении 7 очень сильный акцептор электронов, проявляло невысокую ингибирующую активность (табл. 1).

Далее было изучено ингибирование интеграции 6-нитро-БФКС и 6-нитро-БФЗ (табл. 1, **25** и **26**). Оказалось, что оба эти соединения значительно более эффективно ингибируют интеграцию, чем 4-нитро-БФКС/БФЗ и 4,6-динитро-БФКС (табл. 1, **4**, **11**, **21**). Интересно, что действие 6-нитро-БФКС и 6-нитро-

БФЗ в реакции переноса цепи было одинаковым, а 3'-процессинг более эффективно ингибировался 6-нитро-БФЗ (**25**). Введение метоксигруппы в положение 4 значительно снижало эффективность ингибирования (табл. 1, **27**).

Способность БФКС и БФЗ, содержащих нитрогруппу в положении 4 и/или 6, ингибировать обе реакции, катализируемые ИН ВИЧ-1, с практически одинаковой эффективностью, дала основание предполагать, что механизм ингибирования интеграции этими соединениями отличается от механизма действия ралтегравира, который ингибирует главным образом перенос цепи [15]. Для проверки этого предположения изучена способность нитро-БФКС/БФЗ ингибировать мутантные формы ИН, обладающие повышенной устойчивостью к ралтегравир.

#### Ингибирование мутантных форм ИН, обладающих повышенной устойчивостью к действию ралтегравира

Возникновение устойчивости к ингибиторам переноса цепи связано с появлением мутаций в активном центре ИН [25]. У больных с устойчивостью к ралтегравир чаще всего обнаруживаются первичные мутации: Y143R/C, Q148K/R/H и N155H. Аминокислотные замены Q148R/H/K и N155H часто встречаются также у пациентов, принимавших ингибитор ИН элвитегравир, который находится на последней стадии клинических испытаний [26]. По этой причине в нашей работе использованы препараты ИН, содержащие замены Q148K и N155H. Учитывая, что замена Q148 резко снижает активность ИН, которая восстанавливается в результате вторичной мутации остатка G140 [27], мы получили препарат ИН, содержащей двойную мутацию G140S/Q148K. Была прове-

Таблица 3. Влияние нитро-БФКС и нитро-БФЗ на каталитическую активность ИН в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи, на ДНК-связывающую активность ИН и связывание ДНК-субстрата в активном центре ИН

Соединение, №	Ингибирующая активность, IC <sub>50</sub> , мкМ*					
	3'-процессинг		перенос цепи		связывание ИН с ДНК	связывание ДНК в активном центре ИН
	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>		
	1	2	3	4	5	6
Ралтегравир	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.005 ± 0.002	> 500	> 500
<b>6</b>	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	10 ± 2	0.6 ± 0.2
<b>9</b>	50 ± 10	35 ± 10	80 ± 30	70 ± 20	500 ± 100	90 ± 20
<b>18</b>	20 ± 5	20 ± 5	15 ± 5	25 ± 5	50 ± 10	20 ± 5
<b>23</b>	6 ± 2	5 ± 2	2.0 ± 0.5	5 ± 2	25 ± 8	6 ± 2
<b>25</b>	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.2	5 ± 2	4 ± 1	45 ± 10	1.0 ± 0.5

\*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

рена способность наиболее активных соединений **6**, **22** и **25**, представляющих все три исследованные группы нитро-БФКС/БФЗ, ингибировать каталитическую активность мутантных белков и ИН дикого типа в реакции переноса цепи. Оказалось, что анализируемые ингибиторы подавляли активность всех препаратов ИН со сравнимой эффективностью (табл. 2). В то же время обе мутантные формы ИН ингибировались ралтегравиром хуже, чем ИН дикого типа, при этом снижение эффективности ингибирования было особенно заметно для значений IC<sub>95</sub> (табл. 2).

#### Изучение механизма ингибирующего действия производных нитро-БФКС/БФЗ

Способность производных нитро-БФКС/БФЗ ингибировать мутантные формы ИН так же эффективно, как и фермент дикого типа, подтвердила правильность предположения о том, что механизм ингибирования интеграции этими соединениями отличается от механизма действия ралтегравира. Соединения для выяснения механизма ингибирующего действия производных нитро-БФКС/БФЗ отбирали с учетом двух критериев: 1) выбирали соединения из всех трех групп производных, различающихся положением и количеством нитрогрупп; 2) выбирали соединения с разными заместителями, поскольку формирование заместителем дополнительных контактов с белком потенциально могло повлиять на механизм ингибирования. Соответственно из группы 4-нитро-БФКС/БФЗ отобрали соединения **6**, **9** и **18**; из группы 4,6-динитро-БФКС – соединение **23**, из группы 5-нитро-БФКС/БФЗ – соединение **25** (табл. 1).

Необходимо отметить, что все ингибиторы переноса цепи действуют по одному механизму: они

связываются в активном центре ИН, находящейся в комплексе с вирусной ДНК, и препятствуют ее взаимодействию с клеточной ДНК [5, 15, 28]. Соединения, одинаково ингибирующие обе стадии интеграции, могут иметь разные механизмы действия. Они могут взаимодействовать с С-концевым доменом, нарушая связывание ДНК, могут связываться с каталитическим доменом ИН, влияя или не влияя на правильную укладку вирусной ДНК, они могут взаимодействовать с другими участками ИН, будучи, например, аллостерическими ингибиторами [5, 29].

На первом этапе изучено влияние ингибиторов на ДНК-связывающую активность ИН. За связывание ДНК в первую очередь ответствен С-концевой домен ИН [30]. Следовательно, ингибитор, который подавляет связывание ДНК в тех же концентрациях, что и 3'-процессинг, действует на С-концевой домен. Действие ингибиторов на связывание ДНК изучали при 25°C, поскольку в таких условиях ИН полностью связывает ДНК-субстрат, образуя фермент-субстратный комплекс, но не осуществляет каталитический акт [31]. Оказалось, что практически все изученные соединения в гораздо меньшей степени влияли на связывание ДНК с ИН, чем на 3'-процессинг (табл. 3, столбцы 5 и 1). Этот факт позволил предположить, что ингибиторы взаимодействуют с каталитическим доменом ИН.

Ингибитор, который связывается в каталитическом домене ИН, может, не влияя на общее связывание ДНК с ИН, препятствовать «правильному» взаимодействию вирусной ДНК с активным центром фермента. Влияние ингибиторов на правильную укладку ДНК-субстрата в активном центре ИН изучали с использованием метода ковалентного присоединения

Таблица 4. Спектры потенциальной токсичности/побочных эффектов нитро-БФЗ и нитро-БФКС в сравнении с ралтегравиром

Соединение, №	Прогнозируемые токсические и побочные эффекты (Pa > 0.5)		
	Pa*	Pi*	Активность
6	0.536	0.068	Гипотензия
	0.503	0.085	Сосудистая токсичность
9	-	-	-
18	0.595	0.015	Канцерогенность (крысы, самцы, почки)
	0.551	0.014	Канцерогенность (крысы, самцы)
	0.519	0.020	Стимулятор слезной секреции
23	0.653	0.005	Мутагенная
	0.556	0.006	Мутагенная
25	0.816	0.014	Сосудистая токсичность
	0.679	0.007	Канцерогенность (крысы, самцы)
	0.661	0.008	Канцерогенность (крысы, самки)
	0.632	0.019	Продление QT-интервала
	0.571	0.013	Канцерогенность (крысы, самки, молочная железа)
	0.603	0.049	Гипотензия
	0.588	0.034	Аллергический дерматит
	0.583	0.047	Цианоз
	0.570	0.045	Ототоксичность
	0.568	0.074	Гемотоксичность
Ралтегравир	0.933	0.003	Гиперкинезия
	0.932	0.004	Атаксия
	0.923	0.004	Чувство тревоги
	0.861	0.013	Головокружение
	0.850	0.010	Тромбоцитопения
	0.830	0.017	Сенсорные нарушения
	0.796	0.023	Рвота
	0.780	0.016	Дискинезия
	0.787	0.025	Дерматит
	0.783	0.022	Головная боль
	0.781	0.024	Аллергическая реакция
	0.744	0.031	Боль
	0.702	0.040	Тошнота
	0.683	0.032	Нефротоксичность
	0.693	0.042	Нарушение сна
	0.603	0.065	Гемотоксичность
	0.589	0.073	Желудочно-кишечная токсичность
0.556	0.065	Гепатотоксичность	

\*Pa – вероятность наличия активности; Pi – вероятность отсутствия активности.

к ИН альдегидсодержащего аналога ДНК-субстрата [32]. Альдегидную группу вводили в состав третьего с 5'-конца олигонуклеотида U5A модифицированного аналога тимидина ( $T^m$ ) (рисунки, А), поскольку он локализован вблизи аминокислотных остатков каталитического домена ИН [33]. Целесообразность применения такого подхода описана ранее [34, 35].

Дуплекс U5B/U5A<sup>m</sup>, содержащий радиоактивную метку в цепи U5A<sup>m</sup>, ковалентно присоединяли к ИН в присутствии ингибиторов в возрастающих концентрациях и анализировали влияние ингибиторов на эффективность реакции (рисунки, Б). В случае ралтегравира мы не обнаружили ингибирования ковалентного присоединения (табл. 3, столбец 6), что хорошо согласуется с данными о том, что ингибиторы переноса цепи не влияют на взаимодействие ИН с вирусной ДНК [5, 15]. Значения  $IC_{50}$  для всех производных нитро-БФКС/БФЗ при подавлении ковалентного связывания ДНК в активном центре фермента были близки значениям  $IC_{50}$ , полученным для катализа (табл. 3, столбцы 6 и 1). Это указывает на то, что ингибиторы взаимодействуют с активным центром ИН и препятствуют правильной укладке в нем ДНК-субстрата. При этом связывание ингибиторов не вызывает изменений структуры фермента, способных полностью блокировать его ДНК-связывающую активность.

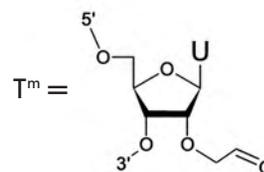
Исходя из предположения, что производные нитро-БФКС/БФЗ связываются в активном центре ИН, мы решили выяснить, взаимодействуют ли они с ионами металла-кофактора, связанными в активном центре ИН и необходимыми для каталитической активности [36]. Природным кофактором ИН является  $Mg^{2+}$ , однако *in vitro* ИН эффективно катализирует обе реакции и в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ . Если ингибитор взаимодействует с ионом металла, то из-за различий в координирующей способности  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  влияние ингибитора на активность ИН в присутствии этих ионов металлов будет различаться. Именно этот эффект наблюдается в случае ралтегравира (табл. 3, столбцы 1–4). Результаты ингибирования 3'-процессинга и переноса цепи в присутствии ионов разных металлов показывают, что тип металла не влияет на эффективность действия производных нитро-БФКС/БФЗ. Очевидно, что взаимодействие этих ингибиторов с активным центром ИН осуществляется не за счет связывания с ионом металла.

### Прогноз фармакодинамических и фармакокинетических характеристик производных нитро-БФКС/БФЗ

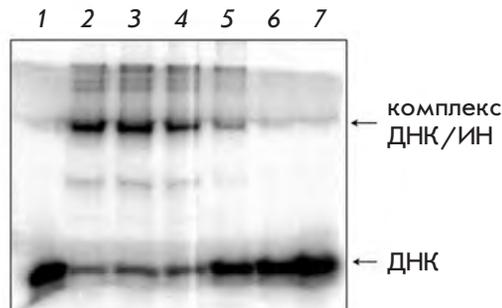
С использованием стандартной версии программы PASS (версия 12.06.22) предсказаны возможные побочные и токсические эффекты соединений **6**, **9**, **18**,

А

U5B 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3'  
U5A<sup>m</sup> 3'-CACACCTTTAGAGATCGT<sup>m</sup>CA-5'



Б



Влияние соединения **6** на эффективность ковалентного присоединения аналога ДНК-субстрата, содержащего альдегидную группу, к ИН. А – Структура аналога ДНК-субстрата U5B/U5A<sup>m</sup> и модифицированного аналога тимидина  $T^m$ . Курсивом и подчеркиванием выделен динуклеотид GT, отщепляемый ИН при 3'-процессинге. Б – Анализ влияния ингибитора **6** на ковалентное присоединение дуплекса U5B/U5A<sup>m</sup> к ИН методом гель-электрофореза по Лэммли. **6**, мкМ: 1 – контроль; 2 – 0; 3 – 0.1; 4 – 0.5; 5 – 1.0; 6 – 10; 7 – 100

**23**, **25** и ралтегравира (табл. 4). Необходимо отметить, что 15 из 18 предсказанных ( $P > 0.5$ ) токсических и побочных эффектов ралтегравира соответствуют данным, полученным в экспериментальных и клинических исследованиях [37]. В предсказанных спектрах биологической активности соединения **9** отсутствуют какие-либо побочные/токсические эффекты. Соединения **6**, **18**, **23** и **25** могут вызывать некоторые нежелательные эффекты, однако необходимо учитывать, что прогнозируемые PASS побочные эффекты могут проявляться при их концентрациях, превышающих терапевтические дозы.

Расчет ADME-характеристик программой QikProp показал, что у соединений **6**, **9**, **18**, **23** и **25** значения всех 18 параметров соответствуют рекомендуемому диапазону [13]. Из этого диапазона (меньше чем -5) [14] у ралтегравира выходит расчетная величина  $IC_{50}$  для блокады HERG  $K^+$ -каналов. Это соответствует

данным [38], в соответствии с которыми ралтегравир в высоких концентрациях действует как блокатор HERG K<sup>+</sup>-каналов, что может привести к увеличению QT-интервала и, следовательно, к развитию сердечной недостаточности.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе охарактеризован выявленный на основе компьютерного прогноза новый класс ингибиторов ИН – нитро-БФКС и нитро-БФЗ. Показано, что эти соединения ингибируют 3'-процессинг так же или более эффективно, чем перенос цепи. Изучено влияние структуры нитро-БФКС и нитро-БФЗ на их ингибирующую активность. Наиболее активными ингибиторами интеграции оказались 4-нитро-БФЗ/БФКС, содержащие метильную группу в положениях 5 и 7, а также 5-нитро-БФЗ. Описанные ингибиторы проявляли активность и в отношении мутантов ИН, устойчивых к действию ралтегравира. Изучение механизма ингибирования ИН

под действием нитро-БФЗ и нитро-БФКС показало, что эти соединения препятствуют связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента и не взаимодействуют с ионом металла-кофактора. Сравнение фармакодинамических и фармакокинетических характеристик изученных веществ и ралтегравира свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения этих соединений в качестве ингибиторов ИН ВИЧ-1. ●

*Авторы выражают искреннюю признательность Marc Nicklaus с сотрудниками (NCI/NIH) за выполненные расчеты ADME-параметров изучаемых соединений с использованием компьютерной программы QikProp.*

*Работа поддержана ФЦП Минобрнауки РФ (государственный контракт № 16.512.11.2193) и РФФИ (гранты № 11-04-01004\_a и № 11-04-01586\_a).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cara A., Guarnaccia F., Reitz M.S. Jr., Gallo R.C., Lori F. // *Virology*. 1995. V. 208. P. 242–248.
2. Marcelin A.G., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F., Calvez V. // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2009. V. 4. P. 531–537.
3. FDA approves raltegravir tablets // *AIDS Patient Care STDS*. 2007. V. 21. № 11. P. 889.
4. Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
5. Королев С.П., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 3. С. 13–30.
6. Kobayashi M., Nakahara K., Seki T., Miki S., Kawachi S., Suyama A., Wakasa-Morimoto C., Kodama M., Endoh T., Oosugi E., et al. // *Antiviral Res.* 2008. V. 80. № 2. P. 213–222.
7. Keseru G.M., Makara G.M. // *Nat. Rev. Drug Discovery*. 2009. V. 8. P. 203–212.
8. Johnson B.C., Metifiot M., Pommier Y., Highes S.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 411–419.
9. Ma K., Wang P., Fu W., Wan X., Zhou L., Chu Y., Ye D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. № 22. P. 6724–6727.
10. Ko G.M., Reddy A.S., Garg R., Kumar S., Hadaegh A.R. // *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2012. V. 8. № 4. P. 255–270.
11. Filimonov D.A., Poroikov V.V. / Probabilistic approach in activity prediction. In: *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening* // Eds Varnek A., Tropsha A. Cambridge (UK): RSC Publ., 2008. P. 182–216.
12. Филимонов Д.А., Пороиков В.В. // *Рос. хим. журн.* 2006. Т. 50. № 2. С. 66–75.
13. Акимов Д.В., Филимонов Д.А., Приказчикова Т.А., Готтих М.Б., Пороиков В.В. // *Биомед. химия*. 2005. Т. 51. № 3. С. 335–340.
14. Дружиловский Д.С., Филимонов Д.А., Лиао Ч., Пич М., Никлаус М., Пороиков В.В. // *Биомед. химия*. 2009. Т. 55. № 5. С. 544–557.
15. Summa V., Petrocchi A., Bonelli F., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., Fiore F., Gardelli C., Gonzalez Paz O., Hazuda D.J., et al. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 18. P. 5843–5855.
16. <http://www.schrodinger.com/products/14/17/>
17. Handzlik J., Bajda M., Zygmunt M., Maciąg D., Dybała M., Bednarski M., Filipek B., Malawska B., Kieć-Kononowicz K. // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. V. 20. № 7. P. 2290–2303.
18. Shukla S., Kumar P., Das N., Moorthy N.S., Shrivastava S.K., Trivedi P., Srivastava R.S. // *Med. Chem.* 2012. V. 8. № 5. P. 834–845.
19. Ghose A.K., Herbertz T., Hudkins R.L., Dorsey B.D., Mallamo J.P. // *ACS Chem. Neurosci.* 2012. V. 3. № 1. P. 50–68.
20. Ghosh P.B., Whitehouse M.W. // *J. Med. Chem.* 1968. V. 11. P. 305–311.
21. Ghosh P.B. // *J. Chem. Soc. B*. 1968. P. 334–338.
22. Terrier F., Croisat D., Chatrousse A.-P., Pouet M.-J., Halle J.-C., Jacob G. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 3684–3689.
23. Зацепин Т.С., Качалова А.В., Романова Е.А., Стеценко Д.А., Гейт М.Дж., Орецкая Т.С. // *Биоорг. химия*. 2001. Т. 27. С. 45–51.
24. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.-F. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 9285–9294.
25. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wiriden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
26. Ceccherini-Silberstein F., Malet I., D'Arrigo R., Antinori A., Marcelin A.G., Perno C.F. // *AIDS Rev.* 2009. V. 11. № 1. P. 17–29.
27. Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 1193–1201.
28. Hare S., Vos A.M., Clayton R.F., Thuring J.W., Cummings M.D., Cherepanov P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 20057–20062.
29. Quashie P.K., Sloan R.D., Wainberg M.A. // *BMC Med.* 2012. V. 10. P. 34.
30. Puras Lutzke R.A., Vink C., Plasterk R.H. // *Nucl. Acids Res.*

1994. V. 22. № 20. P. 4125–4131.
31. Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.-C., Mouscadet J.-F., Deprez E. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 1137–1151.
32. Michel F., Crucifix C., Granger F., Eiler S., Mouscadet J.-F., Korolev S., Agapkina J., Ziganshin R., Gottikh M., Nazabal A., et al. // EMBO J. 2009. V. 28. P. 980–991.
33. Krishnan L., Li X., Naraharisetty H.L., Hare S., Cherepanov P., Engelman A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 36. P. 15910–15915.
34. Johnson A.A., Marchand C., Patil S.S., Costi R., Di Santo R., Burke T.R. Jr., Pommier Y. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 71. № 3. P. 893–901.
35. Королев С.П., Ташлицкий В.Н., Смолов М.А., Громыко А.В., Жузе А.Л., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. № 4. С. 718–727.
36. Neamati N., Lin Z., Karki R.G., Orr A., Cowansage K., Strumberg D., Pais G.C., Voigt J.H., Nicklaus M.C., Winslow H.E., et al. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. № 26. P. 5661–5670.
37. [http://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/i/isentress/isentress\\_pi.pdf](http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/i/isentress/isentress_pi.pdf)
38. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000860/WC500037408.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000860/WC500037408.pdf)

УДК 573.6.086.83:577.21:[577.152.311+612.015.1]

# Рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека как биологический антидот нового поколения: разработка эукариотической системы экспрессии

Д. Г. Илюшин<sup>1</sup>, О. М. Эртле<sup>1</sup>, Т. В. Бобик<sup>1</sup>, О. Г. Шамборант<sup>1</sup>, Е. А. Сурина<sup>1</sup>, В. Д. Кнорре<sup>1</sup>, P. Masson<sup>2</sup>, И. В. Смирнов<sup>1</sup>, А. Г. Габибов<sup>1</sup>, Н. А. Пономаренко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Département de Toxicologie, La Tronche, France

\*E-mail: llyushinDenis@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2012

**РЕФЕРАТ** Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза [КФ 3.1.1.8], которая характеризуется высокой реакционной способностью стехиометрически связывать разнообразные токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу, и обнаруживается практически во всех тканях млекопитающих. Это делает бутирилхолинэстеразу человека первым кандидатом на роль биологического антидота, действие которого направлено на различные фосфорорганические яды. Получение рекомбинантной БуХЭ в количествах, достаточных для инъекционного введения, затруднено из-за низкой эффективности существующих систем экспрессии. В представленной работе разработана эффективная система экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека на основе клеток линии СНО, а также охарактеризован белок, полученный с использованием этой системы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биологический антидот, бутирилхолинэстераза, клетки линии СНО, рекомбинантный белок, фосфорорганические токсины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** а.о. – аминокислотный остаток; БуХЭ – бутирилхолинэстераза; ПААГ – полиакриламидный гель; ФОТ – фосфорорганический токсин; СНО – Chinese hamster ovary cells (клетки яичников китайского хомячка *Cricetulus griseus*); DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла).

## ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза [КФ 3.1.1.8], обнаруженная практически во всех тканях млекопитающих, в частности в тканях легкого, кишечника, печени и в сыворотке крови [1]. Физиологическая функция БуХЭ не известна, но считается, что она играет важную роль в поддержании и контроле активности нейромедиаторов ацетилхолина в центральной нервной системе и нервно-мышечных окончаниях [2].

БуХЭ обладает способностью стехиометрически связывать разнообразные токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу. В частности, БуХЭ взаимодействует с такими фосфорорганическими соединениями, как зарин, зоман, газы VX и VR и некоторыми пестицидами. Эти данные получены в опытах на грызунах [3] и приматах [4]; после внутривенного или внутримышечного введения препарата БуХЭ, выделенной из сыворотки крови человека, у животных обнаруживалась длительная устойчивость к действию нервно-паралитических агентов [5].

За последние 60 лет исследований методы медикаментозного лечения отравлений фосфорорганическими токсинами (ФОТ) активно развивались. Тем не менее все они еще несовершенны. Эти методы позволяют предотвратить смерть пациента, но не позволяют избежать необратимых поражений головного мозга и потери трудоспособности. Альтернативным подходом к медикаментозной терапии и профилактике отравлений ФОТ является использование биологических антидотов [6]. Биологическими антидотами могут быть антитела и ферменты, которые изолируют и инактивируют высокотоксичные соединения, до того как они достигнут своей биологической мишени [7]. Из всех антидотов против ФОТ только БуХЭ плазмы крови человека получила статус «New development drug» от FDA в 2006 году.

Бутирилхолинэстераза человека – гликопротеин, состоящий из четырех идентичных субъединиц. Каждая субъединица состоит из 574 а.о. и 9 полисахаридных цепей. Молекулярная масса одной субъе-

диницы БуХЭ составляет 85 кДа, из которых 23.9% приходится на полисахаридные цепи [8]. Существует несколько олигомерных форм БуХЭ: в плазме крови человека 95% БуХЭ представлено тетрамерной формой, остальные 5% приходятся на тримерную, димерную и мономерные формы [9], иногда обнаруживается гетеродимер БуХЭ с сывороточным альбумином [10]. Олигомерные формы БуХЭ обладают одинаковой удельной активностью, однако сильно различаются по фармакодинамическим характеристикам [3].

На сегодняшний день бутирилхолинэстеразу человека выделяют из плазмы крови. Опубликованный в 2005 году протокол очистки рассчитан на обработку 100 л плазмы крови человека за один цикл [4]. По оценке экспертов, для получения 1000 доз БуХЭ потребуется переработать годовой запас плазмы крови США [11]. Кроме того, при использовании донорской плазмы существует вероятность заражения препарата опасными вирусами.

Альтернативным методом является получение рекомбинантного белка. Экспрессия в клетках прокариот – технологически наиболее простой и экономически выгодный метод получения рекомбинантных белков. Однако попытки экспрессии БуХЭ в клетках *Escherichia coli* не были успешными [12].

Для получения корректно фолдированных и функционально активных рекомбинантных продуктов в последнее время широко используются культивируемые клетки животных, в частности клетки линии СНО. За последние 25 лет получено и одобрено FDA более 20 рекомбинантных белковых препаратов, в том числе альблукозидаза  $\alpha$  (Myozyme) [13], антигемофильный фактор (ReFacto) [14], фактор свертывания крови IX (BeneFIX) [15], интерферон- $\beta$  (Avonex) [16],  $\alpha$ -галактозидаза (Fabrazyme) [17], эритропоэтин А (Eprex, Erogen) и др. Для эффективной экспрессии рекомбинантных белков в животных клетках разработан целый ряд технических средств, таких, как роллерные системы, спиннеры и биореакторы, позволяющие обеспечить продукцию целевого белка в количестве нескольких грамм на 1 л культуральной среды [18–20]. Кроме того, эффективность экспрессии достигается использованием сильных промоторов, таких, как промотор гена фактора элонгации 1 $\alpha$  (EF-1) [21] или цитомегаловирусный (CMV) промотор [22].

В 2002 году удалось получить рекомбинантную низкогликозилированную БуХЭ в нелимфоидных клетках линии СНО [23]. При продукции в роллерных бутылках выход целевого белка составил 2–5 мг на 1 л ростовой среды, тогда как для обеспечения рентабельности производства требуется достичь уровня продукции не менее 50–100 мг/л ростовой среды.

Помимо непосредственного увеличения уровня продукции рекомбинантной БуХЭ внимание исследователей

сосредоточено также на получении препарата с улучшенными фармакодинамическими характеристиками. Недавно в составе тетрамера бутирилхолинэстеразы человека обнаружены пептиды неизвестного происхождения с молекулярной массой от 2072 до 2878 Да и общей аминокислотной последовательностью PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP. Считается, что эти пептиды играют важную роль в формировании четвертичной структуры БуХЭ, связываясь с С-концевыми доменами ее субъединиц [24]. Показано, что в этой роли может выступать и пролин-богатый N-концевой домен коллагеноподобного белка ColQ – PRAD (proline rich attachment domain): коэкспрессия пептида PRAD, состоящего из 45 а.о., с рекомбинантной БуХЭ в клетках линии СНО приводит к увеличению доли тетрамерной изоформы БуХЭ до 70% [25].

В 2007 году американскому исследователю Huang Y.J. и соавт. удалось создать трансгенных коз, молоко которых содержит рекомбинантную БуХЭ. Показано, что в 1 л молока трансгенных животных обнаруживается от 1 до 5 г активной БуХЭ. Однако полученный таким образом фермент недостаточно гликозилирован, что значительно снижает его фармакологические показатели [26].

В 2010 году группе американских, канадских и израильских ученых удалось экспрессировать БуХЭ в клетках трансгенных растений [27]. После избыточного пэггилирования фармакодинамические характеристики рекомбинантного фермента были сопоставимы с характеристиками БуХЭ плазмы крови человека. К сожалению, применение такого препарата затруднено, поскольку этот способ получения рекомбинантных продуктов в качестве лекарственных средств в настоящее время не разрешен FDA.

Таким образом, на сегодняшний день не существует эффективной и экономически выгодной системы экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека. Создание такой системы экспрессии стало целью данной работы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы и материалы

В работе использовали реактивы фирм «Panreac», «Amresco» и «Sigma» (США); «Merck» (Германия); наборы для выделения плазмидной ДНК, очистки ПЦР-фрагментов, экстракции ДНК из агарозного геля («Qiagen», США); ферменты рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты («Fermentas», Литва); ростовые среды и компоненты ростовых сред («Gibco», США); векторы pсDNA3.1/Hygro, pBudCE4.1 («Invitrogen», США), pET28a («Novogen», США).

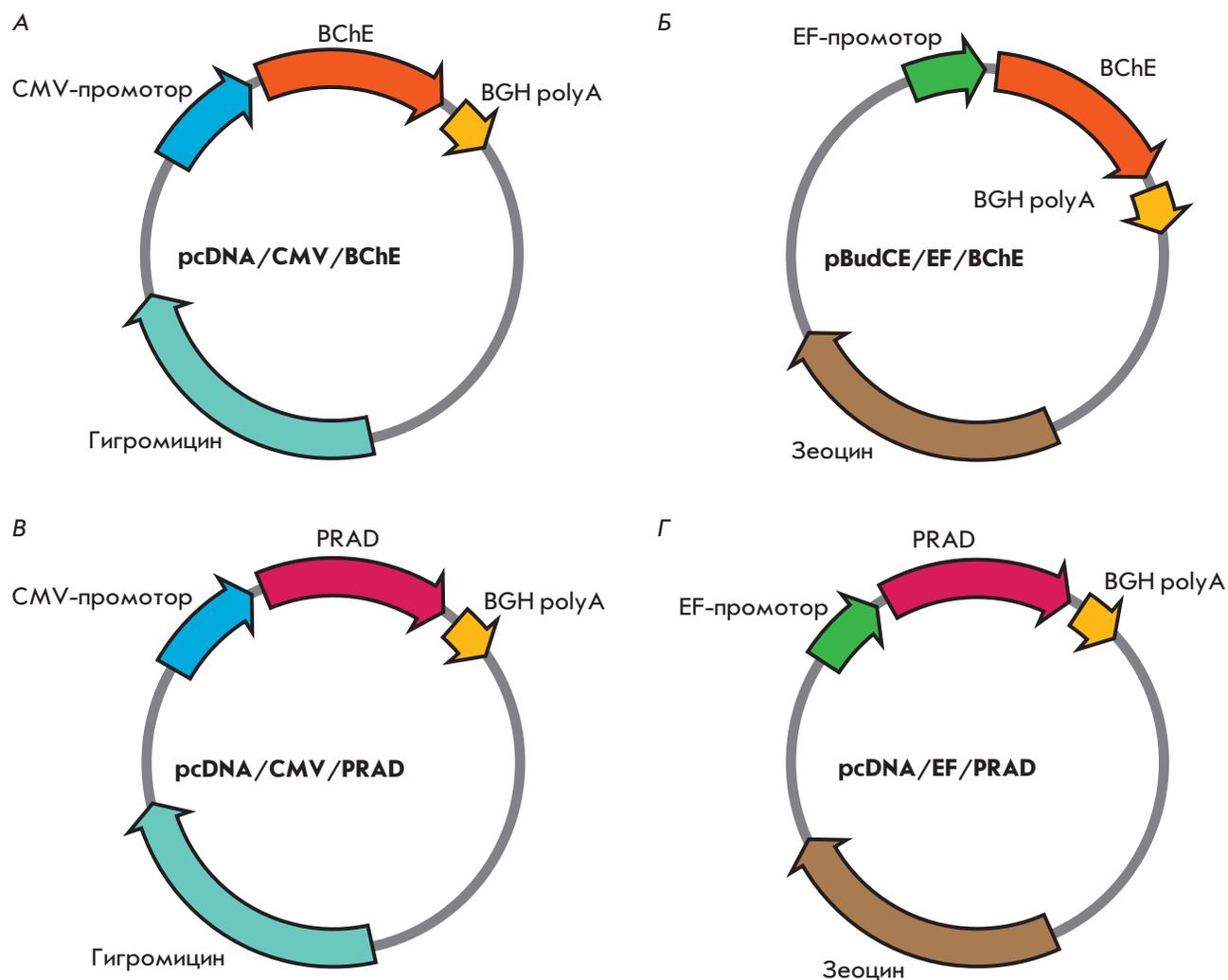


Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионных конструкций pcDNA/CMV/BChE (А), pBudCE/EF/BChE (Б), pcDNA/CMV/PRAD (В) и pcDNA/EF/PRAD (Г)

Плазмиды pGS/BChE и pRc/RSV-rQ45 предоставлены П. Массоном (CRSSA, La Tronche, France) и О. Локридж (UNMC, Omaha, USA).

#### Бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) и XL2-Blue («Novagen», США).

#### Клеточные линии

В работе использовали клеточную линию CHO-K1 («Sigma», США) с применением общих методов ведения линий клеток животных [28]. Клетки выращивали в культуральных флаконах или планшетах в среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и 2 мМ *L*-глутамин, в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### Создание экспрессионных конструкций

1) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/Hygro/CMV/BChE (рис. 1А).

Плаزمида pGS/BChE, несущая фрагмент ДНК, кодирующий БуХЭ человека, была обработана эндонуклеазами рестрикции HindIII и ApaI. Фрагмент ДНК длиной 1914 п.н. был очищен методом электрофореза в 1% агарозном геле с последующей элюцией с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit и лигирован в расщепленный теми же рестриктазами и дефосфорилированный вектор pcDNA3.1/Hygro.

2) Создание экспрессионной конструкции pBudCE/EF/BChE (рис. 1Б).

Для получения данной конструкции вектор pBudCE4.1 модифицировали. Фрагмент ДНК, со-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования

Праймер 1	TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC
Праймер 2	GAA GAA GCT TGT ACA ATA TGC ATA GCA AAG TCA CAA TC
Праймер 3	AAG TGG TTC CTT TAA TGC TCC T
Праймер 4	ATA TGC GGC CGC TCA TTC TAA GAC ACT TGA TTA TTT CAG T
Праймер 5	ATA TGC TAG CGA AGA TGA CAT CAT AAT TGC AAC A
Праймер 6	ATA TGC GGC CGC TCA CAG AAA CTT GCC ATC ATA AAC ATG
Праймер 7	ATA TGC TAG CGC TCG GGT TGA AAG AGT TAT TGT
Праймер 8	ATA TGC GGC CGC TCA GCA ACC AGT CAA TTT AGC TAA GTT

ответствующий CMV-промотору, удаляли. Таким образом был создан вектор pBudCE/EF. Плазмиду pGS/VChE обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BglII. Нужный фрагмент ДНК длиной 1832 п.н. очищали, как описано выше, и лигировали в аналогично рестрицированный и дефосфорилированный вектор pBudCE/EF. Положительные клоны с правильной ориентацией фрагментов определяли методом ПЦР с использованием праймеров 1 и 2 (табл. 1).

3) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/CMV/PRAD (рис. 1B).

Плазмиду pRc/RSV-rQ45 [29], содержащую последовательность, кодирующую пептид PRAD и FLAG-эпитоп, обрабатывали эндонуклеазами HindIII и XhoI. Фрагмент длиной 252 п.н. очищали методом электрофореза в 10% ПААГ с последующей электроэлюцией и лигировали в вектор pcDNA3.1/Hygro, соответственно расщепленный и дефосфорилированный.

4) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/EF/PRAD (рис. 1Г).

Плазмиду pBudCE/EF, содержащую EF-промотор, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BglII. Рестрицированную ДНК достраивали с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I, а затем реакционную смесь обрабатывали эндонуклеазой NheI. Фрагмент длиной 1223 п.н. очищали методом электрофореза в 1% агарозном геле с последующей электроэлюцией. Плазмиду pcDNA/CMV/PRAD обрабатывали эндонуклеазой рестрикции HindIII, достраивали с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I и обрабатывали реакционную смесь эндонуклеазой SpeI. Полученный вектор очищали, как описано выше, дефосфорилировали и лигировали с полученным ранее фрагментом ДНК, соответствующим EF-промотору.

5) Создание экспрессионных конструкций pET28-C, pET28-N1 и pET28-N2 (рис. 3А).

Нуклеотидные последовательности, кодирующие С-концевой фрагмент БуХЭ (322 а.о.), а также два

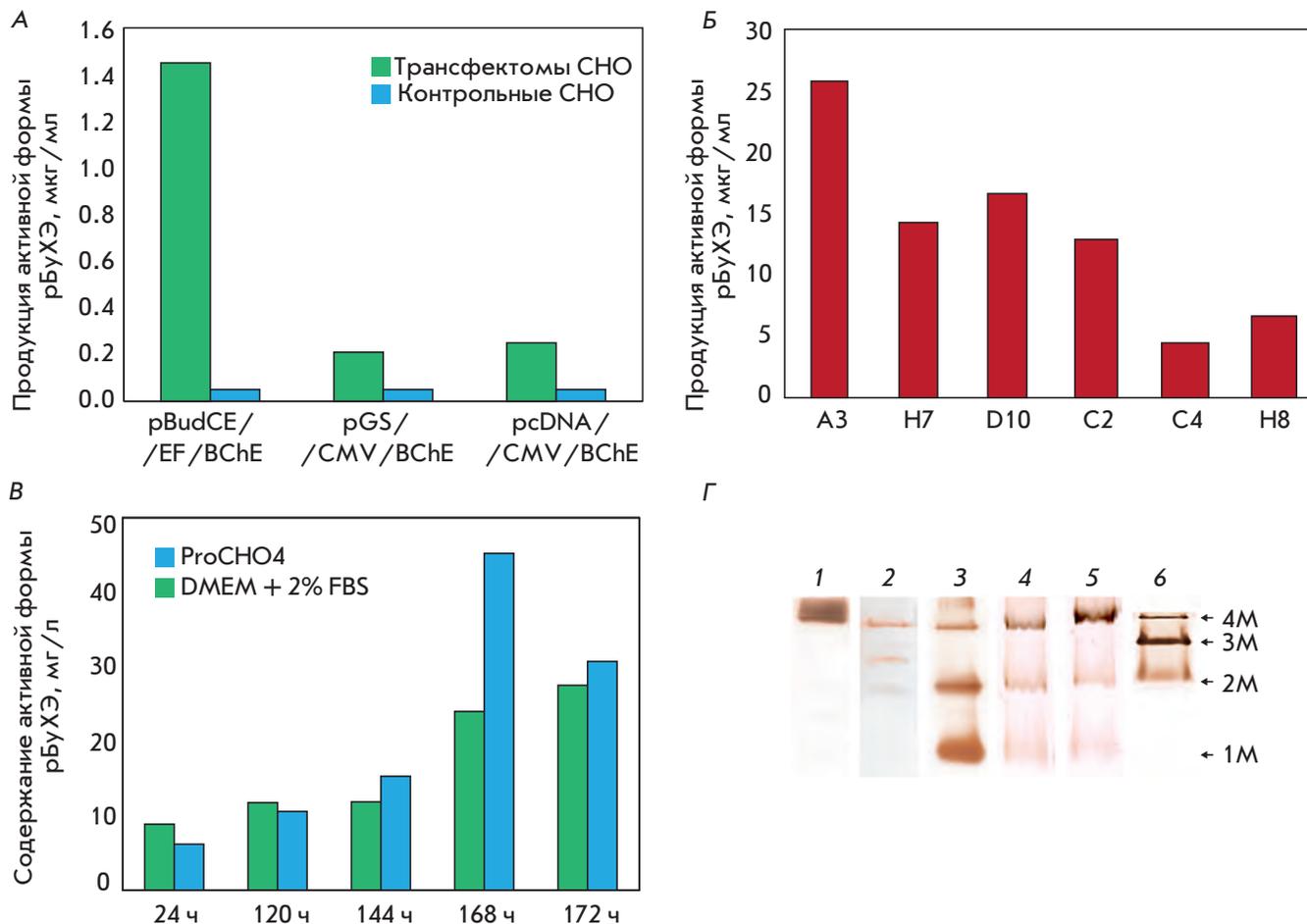
фрагмента N-концевого пептида БуХЭ – N1 и N2 (133 и 119 а.о. соответственно), получены методом ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду pGS/VChE. В реакцию брали следующие пары праймеров: фрагмент С – праймеры 3 и 4; фрагмент N1 – праймеры 5 и 6; фрагмент N2 – праймеры 7 и 8 (табл. 1). ПЦР-продукты С, N1 и N2 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI и NotI и лигировали аналогичным образом рестрицированный и дефосфорилированный вектор pET28a с получением экспрессионных конструкций pET28-C, pET28-N1 и pET28-N2 соответственно.

Лигазными смесями трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма DH5α или XL2-Blue. Первичный скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с колоний. Плазмиды, выделенные из позитивных клонов, дополнительно охарактеризовывали методом рестрикционного анализа. Правильность сборки экспрессионных конструкций и векторов проверяли секвенированием по Сэнгеру. Приготовление электрокомпетентных клеток, трансформацию, обработку рестриктазами, лигирование, ПЦР и электрофорез ДНК проводили по стандартным методикам [30, 31]. Плазмиды выделяли согласно [32].

### Экспрессия и очистка рекомбинантных пептидов БуХЭ

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали методом электропорации конструкциями pET28-C, pET28-N1 или pET28-N2. Пептиды БуХЭ, кодируемые плазмидами, содержали шесть остатков гистидина на С-конце, что позволило выделять их с помощью металлохелатной хроматографии.

Клетки наращивали при 37°C до  $OD_{600} = 0.6$ , после чего индуцировали раствором изопрропилтио-β-D-галактозида (ИПТГ), добавленным до концентрации 1 мМ. Через 6 ч после индукции клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-



**Рис. 2.** Анализ эффективности временной трансфекции клеток линии CHO экспрессионными конструкциями pBudCE/EF/BChE, pGS/CMV/BChE и pcDNA/CMV/BChE (А). Сравнительный анализ продукции БуХЭ отобранными моноклонами после стабильной трансфекции клеток линии CHO линейаризованной конструкцией pBudCE/EF/BChE (Б). Анализ подбора условий экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека клоном А3 в различных ростовых средах (В). Анализ олигомерного состава рБуХЭ методом Карновского. Разделение БуХЭ осуществляли в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях. 1 – Образец плазмы крови человека, 2 – образец очищенной бутирилхолиэстеразы плазмы крови человека, 3 – культуральная среда клона А3, 4 – культуральная среда клона А3 после временной трансфекции конструкцией pcDNA/CMV/PRAD, 5 – культуральная среда клона А3 после временной трансфекции конструкцией pcDNA/EF/PRAD, 6 – культуральная среда клона А3Н9; 4М – тетрамер, 3М – тример, 2М – димер, 1М – мономер (Г)

HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1% Тритон X-100, в объеме, равном 0.1 от исходного.

Все рекомбинантные полипептиды БуХЭ экспрессировались в нерастворимой форме. Для получения фракции телец включения в суспензию клеток вносили лизоцим до конечной концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при 30°C и постоянном помешивании в течение 15 мин, после этого к лизату добавляли MgCl<sub>2</sub> до концентрации 8 mM и ДНКазу до 0.1 мг/мл. Лизат клеток центрифуги-

ровали в течение 15 мин при 13000 об/мин. Осадок, содержащий фракцию нерастворимых белков, последовательно отмывали в растворах, содержащих 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Тритон X-100; 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 M мочевины и 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 8 M мочевины. Полученные фракции анализировали методом белкового электрофореза в 15% ПААГ в восстанавливающих условиях. Полипептиды С и N1 обнаруживались во фракции, содержащей 2

М мочевины, полипептид N2 – в нерастворимой фракции белков.

Затем полипептиды С и N1 очищали с помощью металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях на смоле IMAC Sepharose 6FF («GE Healthcare», США) по методике производителя. Элюаты диализовали против воды, полученной на установке mQ («Millipore», США), осадок осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50% водном растворе этилового спирта до получения мелкодисперсной суспензии.

Полипептид N2 очищали многократной отмывкой нерастворимой фракции раствором, содержащим 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины, 1 мМ β-меркаптоэтанола. Осадок диализовали против воды, полученной на установке mQ («Millipore», США), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50% водном растворе этилового спирта до получения мелкодисперсной суспензии.

#### **Иммунизация мышей полноразмерной БуХЭ плазмы крови человека**

Мыши линии BALB/c были получены из питомника Harlan (Великобритания) и содержались в виварии Филиала Института биоорганической химии РАН в г. Пущине в стерильных условиях, минимизирующих контакт иммунной системы с внешними антигенами (Specific Pathogen-Free-статус). Возраст мышей варьировал от 6 до 8 нед. Иммунизацию проводили, вводя каждой мышши 100 мкг БуХЭ в полном адъюванте Фрейнда дважды с недельным интервалом. Бустирование иммунизированных мышей проводили интраперитонеально за 3 дня до отбора спленоцитов, вводя мышам по 50 мкг БуХЭ в фосфатно-солевом буфере (PBS).

#### **Получение моноклональных антител мыши**

Моноклональные антитела получали по стандартным методикам с использованием клеточных гибридом и асцитов [33, 34]. Моноклональные антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на смоле HiTrap Protein-A («GE Healthcare», США) согласно методике производителя. Биотинилирование антител проводили с помощью NHS-биотина («GE Healthcare», США) по методике производителя.

#### **Иммунизация кроликов рекомбинантными полипептидами БуХЭ**

Иммунизацию кроликов проводили на базе вивария ИБХ РАН. Рекомбинантные полипептиды N1 и N2 БуХЭ вводили подкожно по следующей схеме: первая инъекция – суспензия пептида в полном адъюванте Фрейнда; вторая инъекция (через 28 дней) – суспензия пептида в неполном адъюванте Фрейнда;

третья инъекция (через 14 дней) – суспензия пептида в неполном адъюванте Фрейнда. Каждому животному вводили по 200 мкг пептида в каждой инъекции. Через 7 дней после иммунизации из ушной вены каждого животного отбирали 10 мл крови и получали сыворотку крови. Титр антител определяли методом непрямого ИФА.

#### **Иммуноферментный анализ методом ELISA**

В работе использовали различные варианты иммуноферментного анализа с применением стандартных протоколов тестирования [33, 34].

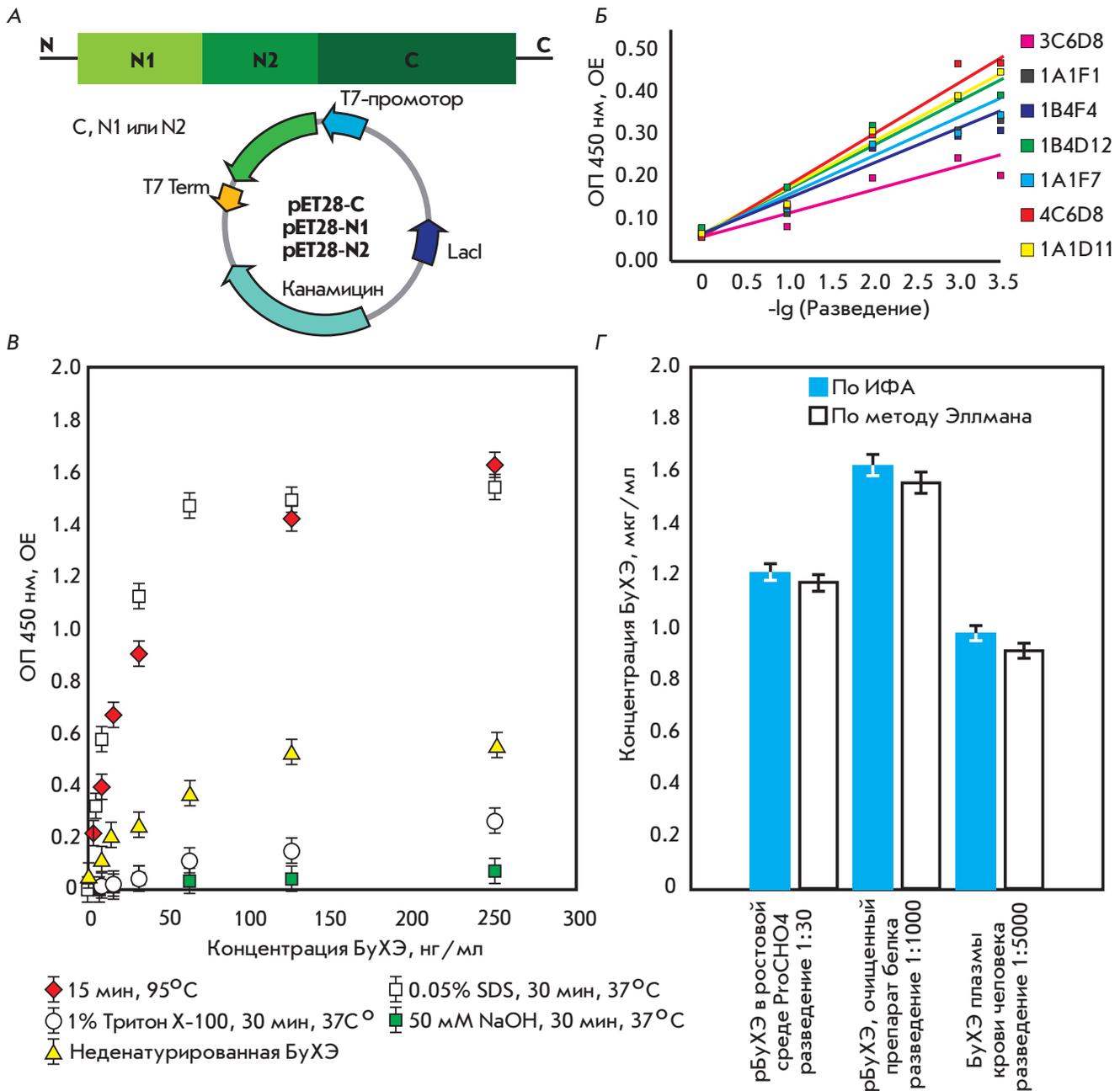
1) Непрямой ИФА использовали для определения титра антител. С этой целью на 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали очищенную БуХЭ плазмы крови человека, и далее вносили моноклональные антитела к БуХЭ в различных разведениях, или на планшетах сорбировали пептиды БуХЭ человека, и затем вносили моноклональные антитела или поликлональные сыворотки кроликов в различных разведениях; комплекс детектировали с помощью антивидовых антител козы, конъюгированных с пероксидазой хрена.

2) Конкурентный ИФА использовали для поиска пары моноклональных антител к БуХЭ человека. Для этого на 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали БуХЭ плазмы крови человека, а затем инкубировали с моноклональными антителами к БуХЭ в различных разведениях в присутствии 10 нг/мл биотинилированного моноклонального антитела 4С6D8. Взаимодействие детектировали с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Стартовая концентрация исследуемых антител составляла 100 нг/мл.

3) «Сандвич» ИФА проводили для определения концентрации БуХЭ. На 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали моноклональные антитела 4С6D8 и инкубировали с образцами БуХЭ, денатурированными при различных условиях (рис. 3Б). Взаимодействие детектировали при помощи поликлональной сыворотки кроликов к полипептиду N1 БуХЭ (титр 1 : 1000). Проявляли с помощью антивидовых антител козы, конъюгированных с пероксидазой хрена.

#### **Трансфекция эукариотических клеток методом липофекции**

Перед проведением трансфекции плазмидные ДНК, предварительно линеаризованные эндонуклеазой рестрикции PvuI или BglII (в случае конструкции pcDNA/EF/PRAD), дополнительно очищали от примесей и солей. Липофекцию проводили с использованием Lipofectamine™ Reagent и Plus™ Reagent («Invitrogen», США) согласно рекомендации производителя.



**Рис. 3.** Фрагменты, кодирующие С-концевой, N1- и N2-полипептиды БуХЭ, и экспрессионные конструкции pET28-C, pET28-N1, pET28-N2 (А). Анализ взаимодействия моноклональных антител с полноразмерной БуХЭ методом конкурентного ИФА. На оси абсцисс указан обратный десятичный логарифм разведения исследуемых антител (стартовая концентрация 100 нг/мл); концентрация биотинилированного антитела 4C6D8 оставалась неизменной и составляла 10 нг/мл. Проявляли конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена (Б). Анализ способов денатурации антигена для определения концентрации бутирилхолинэстеразы методом «сэндвич» ELISA на примере моноклонального антитела 4C6D8. Методика ИФА описана в разделе «Экспериментальная часть» «сэндвич» ELISA и Эллмана (Г)

### Экспрессия рекомбинантной БуХЭ клетками линии СНО

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 2% бычьей фетальной сыворотки и 2 мМ L-глутамин, в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> во флаконах (25 см<sup>2</sup>). По достижению клетками 50–70% конfluenceности отбирали кондиционную ростовую среду и промывали клетки равным объемом стерильного 1 × PBS, после чего добавляли равный объем безбелковой ростовой среды Reprotech («Reprotech», США), EX-Cell («Sigma», США) или ProCHO4 («Lonza», Швейцария). Далее клетки инкубировали в безбелковой ростовой среде в течение 5 сут при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Каждые 24 ч отбирали пробу среды для определения содержания активной формы БуХЭ методом Элмана.

### Определение содержания активной формы фермента БуХЭ человека методом Элмана [35]

Культуральную жидкость (50 мкл) смешивали со 100 мкл стерильного 1 × PBS, 100 мкл полученного раствора переносили в лунку 96-луночного планшета. В качестве контроля для построения калибровочной кривой использовали БуХЭ из плазмы крови человека («Sigma», США). Перед началом измерения в лунки с образцами и контролями вносили 100 мкл раствора 50 мкМ дитионитробензойной кислоты и 100 мкМ бутирилтиохолинйодида в 1 × PBS. Измерения проводили на приборе TECAN GENios при длине волны 405 нм.

### Очистка рекомбинантной БуХЭ человека из ростовой среды

Ростовую среду от клеток линии СНО центрифугировали при 800 g в течение 5 мин для удаления клеток, а затем при 3500 g в течение 15 мин для удаления клеточного дебриса. Супернатант фильтровали через мембраны Millipore HPWH с диаметром пор 0.22 мкм для удаления остатков примесей. Очищенный супернатант 3 раза концентрировали на мембранах Pellicon PLCTK30 («Millipore», США) с последующим разведением буфером нанесения (50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.2, 1 мМ EDTA). Полученный концентрат среды наносили на аффинную смолу Procainamide-Sepharose 4B [4] в режиме рециркуляции на скорости 0.5 мл/мин в течение ночи при +4°C. Рекомбинантную БуХЭ элюировали со смолы градиентом NaCl (0–500 мМ) 15 объемами колонки при скорости потока 0.5 мл/мин. Полученную фракцию белка концентрировали на мембранах Centricon 10 («Millipore»), после чего дополнительно очищали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 («GE Healthcare»).

### Определение содержания изоформ БуХЭ методом Карновского [36]

Электрофоретическое разделение белков в нативных условиях проводили по стандартной методике Лэммли [31] с незначительными модификациями. Для приготовления геля использовали водный стоковый раствор с соотношением акриламид–N,N,N',N'-метилен-бисакриламид = 29 : 1. Концентрирующий (верхний) 4% гель готовили в 0.125 М Трис-НСl, pH 6.9. Разделяющий (нижний) 8% гель готовили в 0.125 М Трис-НСl, pH 8.8. Электрофоретическое разделение проводили в буфере, содержащем 50 мМ глицина, 5 мМ Трис-НСl pH 8.0. Пробы наносили в буфере, содержащем 10% глицерин, 0.2 М Трис-НСl pH 7.5. Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 8–10 мА на одну пластину геля, а в разделяющем геле – при 15–20 мА. После разделения белков в неденатурирующем ПААГ пластину с гелем переносили в раствор, содержащий 125 мМ NaOH, 125 мМ малеиновой кислоты, 11.6 мМ цитрата натрия, 10 мМ CuSO<sub>4</sub>, 550 мкМ гексацианоферрата(III) калия и 2 мМ бутирилтиохолинйодида. Гель инкубировали в растворе в течение 3–8 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере.

### Определение кинетических констант рекомбинантной БуХЭ методом Элмана

Для определения кинетических констант использовали модифицированную реакцию Элмана. Известное количество БуХЭ вносили в раствор, содержащий 1 мМ дитионитробензойную кислоту в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 7.2, концентрация бутирилтиохолинйодида варьировала от 10 мкМ до 1 мМ. Количество активных центров БуХЭ определяли титрованием с диизопропилфторфосфатом (ДФФ). Реакцию проводили при 25°C, оптическое поглощение измеряли при 412 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка системы экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека

Целью нашей работы было создание эффективной системы экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека. Поскольку препарат БуХЭ планируется использовать в качестве средства профилактики и терапии отравлений ФОТ, мы выбрали клетки линии СНО как хорошо изученную и одобренную FDA систему экспрессии рекомбинантных белков.

Для выбора промотора, обеспечивающего наиболее эффективную продукцию БуХЭ, клетки линии СНО были трансфицированы методом липофекции кольцевой плазмидной ДНК конструкций pGS/VChE [37], pcDNA/CMV/VChE (рис. 1А)

и pBudCE/EF/VChE (рис. 1Б), несущих ген бутирилхолинэстеразы человека под контролем различных промоторов. Через 48 и 72 ч после липофекции образцы культуральной среды отбирали для определения содержания активной формы БуХЭ методом Элмана. В качестве контроля использовали кондиционные среды клеток линии СНО, выращенных в тех же условиях, что и трансфектомы. Из результатов, представленных на рис. 2А, видно, что уровень экспрессии конструкций pGS/CMV/VChE и pсDNA/CMV/VChE был сопоставимым и составил около 0.2 мкг/мл, тогда как у pBudCE/EF/VChE он оказался почти на порядок выше (1.45 мкг/мл). Таким образом, конструкция pBudCE/EF/VChE, содержащая ген БуХЭ под контролем промотора EF-1 (фактор элонгации 1), оказалась наиболее перспективной.

Плазмидную ДНК конструкции pBudCE/EF/VChE линейаризовали и трансфицировали методом липофекции в клетки линии СНО для получения стабильно экспрессирующего клона. Через 72 ч после липофекции клетки рассеивали на 24-луночные планшеты из расчета 1 : 12 для получения стабильных трансфектом. Селекцию проводили с использованием зеоцина, который добавляли в ростовую среду в концентрации 600 мкг/мл. После селекции и анализа клетки рассеивали на 96-луночные планшеты для получения моноклонов. Продукцию активной формы БуХЭ на всех этапах определяли по методу Элмана. После сравнительного анализа экспрессии БуХЭ в одинаковых условиях наиболее перспективными моноклонами (рис. 2Б), а также проверки стабильности продукции БуХЭ этими клонами на протяжении пяти поколений пересеванием на 25 см<sup>2</sup> флаконах, для дальнейшей работы отобрали клон А3. Следующим шагом стала адаптация этого клона к продукции БуХЭ на специальных безбелковых средах.

Был протестирован ряд сред, включая Reprotech («Reprotech»), EX-Cell («Sigma») и ProCHO4 («Lonza», Швейцария). Для подбора условий экспрессии клетки клона А3 предварительно наращивали в среде DMEM, содержащей 2% бычьей фетальной сыворотки (FBS). По достижению клетками 70–90% конfluентности среду заменяли на одну из тестируемых безбелковых сред и инкубировали в ней клетки на протяжении нескольких суток. Инкубация в средах Reprotech и EX-Cell приводила к гибели клеток на 1–2 сут. Эти среды были признаны неподходящими для данного моноклона. При инкубации клеток в среде ProCHO4 наблюдался значительный прирост продукции рБуХЭ к 96 ч инкубации (4 сут) (рис. 2В). Падение активности рБуХЭ на 5-е сут, вероятно, обусловлено протеолитической активностью вследствие гибели клеток.

Анализ олигомерного состава рБуХЭ, продуцируемой клоном А3/СНО, по методу Карновского (рис. 2Г, 3) показал, что рБуХЭ в основном представлена в форме мономера, а содержание тетрамерной формы невелико. С фармакологической точки зрения именно тетрамер БуХЭ представляет интерес, поскольку время полувыведения тетрамера из организма составляет 3–4 дня, а мономера – несколько часов [4]. Ранее было показано, что при коэкспрессии БуХЭ и пептида PRAD – домена коллагеноподобного белка ColQ – количество тетрамеризованного продукта увеличивается [37]. Кроме того, добавление в ростовую среду химически синтезированного пептида, входящего в состав БуХЭ, также способствует тетрамеризации рекомбинантного белка [24]. Пептиды PRAD и пролин-богатый пептид БуХЭ очень похожи по структуре и, следовательно, могут обладать близкими свойствами. Однако синтез пептидов, содержащих несколько остатков пролина подряд, сложен, имеет невысокий выход и невыгоден в условиях биотехнологического производства, поэтому мы решили использовать коэкспрессию БуХЭ и пептида PRAD под контролем различных промоторов. Для этого экспрессионные конструкции pсDNA/CMV/PRAD (рис. 1В) и pсDNA/EF/PRAD (рис. 1Г), несущие PRAD под контролем EF- или CMV-промотора, трансфицировали методом липофекции в клетки клона А3. Через 72 ч после трансфекции количество тетрамерной формы БуХЭ в среде контролировали электрофоретически по методу Карновского. По результатам анализа (рис. 2Г, 4, 5) были выбраны клетки клона А3, трансфицированные плазмидой pсDNA3.1/EF/PRAD. Использование EF-промотора в данном случае позволяет получать клетки, продуцирующие большее количество тетрамерной формы БуХЭ. Экспрессионную конструкцию pсDNA/EF/PRAD линейаризовали эндонуклеазой рестрикции BglII и трансфицировали методом липофекции в клетки клона А3 для получения стабильных клонов-продуцентов. Селекцию проводили, добавляя в ростовую среду 1.5 мг/мл гигромицина Б и 600 мкг/мл зеоцина. После селекции и анализа клетки рассеивали на 96-луночные планшеты для получения моноклонов. Продукцию изоформ БуХЭ моноклонами определяли по методу Карновского, и по результатам тестирования был отобран клон А3Н9. После оптимизации условий экспрессии в ростовой среде ProCHO4 («Lonza») по ранее описанной схеме удалось получить стабильно продуцирующий клон А3Н9, характерной особенностью которого является продукция тетрамерной и димерной форм БуХЭ при полном отсутствии мономера (рис. 2Г, 6).

Таблица 2. Очистка рекомбинантной БуХЭ из ростовой среды

Стадия выделения	Общая активность БуХЭ, ед. акт.	Выход, %	Общее количество БуХЭ, мг	Удельная активность, ед. акт./мг
Ростовая среда	915	100	2.03	451
Концентрат среды	890	97	1.96	454
Элюат со стадии аффинной хроматографии	825	90	1.81	456
Гель-фильтрация, фракция 21 мин	650	71.5	1.41	461

### Разработка системы детекции и оценки продукции рекомбинантного белка

В ходе работы оценку эффективности трансфекции и отбор клонов клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантную БуХЭ, проводили по функциональной активности фермента, с применением методик Эллмана [35] и Карновского [36]. В основе этих методик лежит способность БуХЭ гидролизовать бутирилтиохолин, что делает их неприменимыми в случаях, когда БуХЭ неактивна или ингибирована [38, 39].

Известно, что высокий уровень экспрессии рекомбинантных продуктов в клетках эукариот иногда сопровождается снижением их удельной активности, т.е. появлением некоторой доли неактивного белка. Часто это связано с тем, что собственная система посттрансляционных модификаций клетки не справляется с объемом продуцируемого белка, поэтому появляются неактивные продукты с неправильным фолдингом, неотщепленным пропептидом и другими дефектами. Подобные проблемы удается разрешить при коэкспрессии продукта с необходимыми шаперонами или ферментами, вовлеченными в посттрансляционные модификации [40–44]. В связи с этим представлялось интересным оценить удельную активность нашего фермента при экспрессии.

Таким образом, перед нами возникла необходимость разработать систему прямой оценки содержания БуХЭ в образцах. Эту систему планировалось применять для характеристики рекомбинантной БуХЭ, количественного выявления неактивной БуХЭ в ростовой среде, а также для определения удельной активности фермента в процессе выделения и хроматографической очистки. Для определения концентрации белка в образцах наиболее простым и информативным является метод ИФА в формате «сэндвич» ELISA. Анализ коммерчески доступных антител к БуХЭ человека показал, что на сегодняшний день не существует пары неконкурирующих моноклональных антител с возможностью применения в ИФА по типу «сэндвич».

Последовательности, соответствующие С- и N-концевым фрагментам БуХЭ (рис. 3А): С (322 а.о.), N1 и N2 (133 и 119 а.о.), были наработаны в прокариотической системе экспрессии и очищены. Моноклональные антитела 3С6D8, 1А1F1, 1В4F4, 1В4D12, 1А1F7, 4С6D8 и 1А1D11 к полноразмерной БуХЭ человека были получены по стандартной методике [33]. Методом конкурентного ИФА было показано, что все антитела взаимодействуют с С-концевым участком БуХЭ, причем конкурируют друг с другом (рис. 3В). Вестерн-гибридизация с фрагментами БуХЭ подтвердила результаты ELISA (данные не приведены). Для преодоления возникшей проблемы были получены поликлональные сыворотки кроликов с использованием в качестве антигенов рекомбинантных полипептидных фрагментов N1 и N2 БуХЭ. Методом ИФА в сыворотках выявлен одинаковый титр антител к обоим N-концевым фрагментам БуХЭ, однако с полноразмерной БуХЭ лучше связывались антитела к полипептиду N1. Несмотря на высокий уровень специфического взаимодействия антител с БуХЭ в непрямом ИФА, максимальный уровень сигнала в формате «сэндвич» ELISA не превышал 0.6 ОЕ. Мы предположили, что частичная денатурация антигена увеличит доступность эпитопов и повысит тем самым чувствительность метода. Из опробованных методов денатурации БуХЭ (нагревание, добавление детергентов, щелочи) наиболее эффективной оказалась инкубация в течение 15 мин при 95°C (рис. 3В). По результатам анализов из панели моноклональных антител выбрали антитело 4С6D8, проявившее максимальную чувствительность в комбинации с поликлональными кроличьими антителами к N1-полипептиду.

В итоге был разработан количественный метод определения содержания БуХЭ в образцах культуральной среды, очищенных препаратах, а также в плазме крови человека. Сравнение определенной этим методом концентрации БуХЭ в образцах, с результатами, полученными по методике Эллмана, показало, что ферментативной активностью облада-

**Таблица 3.** Кинетические константы гидролиза бутирилхолинйодида рекомбинантной БуХЭ и БуХЭ из плазмы крови человека

Константа	рБуХЭ	БуХЭ плазмы крови [37]
$K_M$ , мкМ	$25 \pm 1$	$23 \pm 2$
$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$49200 \pm 800$	$39900 \pm 1800$
$K_{ss}$ , мкМ	$250 \pm 30$	$140 \pm 20$
$b$	$2.4 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.1$

ют более 95% БуХЭ, экспрессируемой клоном АЗН9 в ростовую среду (рис. 3Г).

### Выделение и функциональный анализ очищенного препарата рБуХЭ

Для изучения функциональной активности рБуХЭ очистили из ростовой среды. Разработанный протокол очистки включал стадии ультрафильтрации, концентрирования, аффинной очистки и гель-фильтрации. На каждой стадии очистки отбирали образец, в котором анализировали содержание активной формы БуХЭ методом Элмана и оценивали количество белка методом ELISA. Данные анализа представлены в табл. 2. Конечный выход белка, полученного с чистотой 95% (по данным электрофореза), составил около 70%.

Кинетические параметры очищенного препарата рекомбинантной БуХЭ определяли в диапазоне концентраций субстрата от 10 до 1000 мкМ при концентрации фермента 5 нМ. На основании этих данных рассчитывали индивидуальные кинетические параметры реакции гидролиза (табл. 3). Сравнение кинетических констант рБуХЭ и БуХЭ из плазмы крови человека показало, что величины  $K_M$  одинаковы в пределах ошибки расчетов и составляют 25 и 23 мкМ [37] соответственно, а константы  $k_2$  (49200 и 39900 мин<sup>-1</sup> соответственно) лишь незначительно различаются, что, по-видимому, связано со способами определения концентрации активных центров изучаемых ферментов. Известно также, что для бутирилхолинэстеразы, полученной из плазмы крови человека, характерна активация субстратом в реакциях с соединениями холинового ряда. Аналогичный эффект наблюдается и в случае гидролиза бутирилхолинйодида рекомбинантной БуХЭ при концентрациях субстрата больше 500 мкМ. Это

позволило рассчитать константу  $K_{ss}$  и параметр  $b$ . Для рекомбинантной БуХЭ параметр  $b$  отличался от литературного значения  $2.5 \pm 0.1$  [37] в пределах ошибки и составил  $2.4 \pm 0.27$ . Таким образом, можно сделать вывод, что полученная рекомбинантная БуХЭ функционально активна, и организация активного центра одинакова у рекомбинантного и природного фермента.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований удалось разработать эффективную систему экспрессии активной бутирилхолинэстеразы человека в клетках линии СНО. Использование промотора EF-1 позволило значительно увеличить продукцию рекомбинантного белка клетками – с 3–5 до 40 мг/л. Рассчитанные кинетические константы свидетельствуют об интактности активного центра фермента. Анализ изоформ рБуХЭ в ростовой среде показал, что фермент продуцируется преимущественно в форме димера и тетрамера.

Разработанная методика ИФА позволила количественно оценить содержание БуХЭ в образцах культуральной среды, очищенных препаратах, а также в плазме крови человека. Сравнение величин концентрации БуХЭ в образцах с данными, полученными по методике Элмана, показало, что более 95% БуХЭ, экспрессируемой клоном АЗН9 в ростовую среду, является активной, и в процессе очистки препарата удельная активность рБуХЭ не снижается.

На следующем этапе работы предполагается дальнейшее улучшение фармакодинамических характеристик рекомбинантного фермента с помощью химических модификаций, таких, как, например, пегилирование [45] или сиамирование [46]. ●

*Авторы выражают благодарность проф. Оксане Локридж (Oksana Lockridge, UNMC, Omaha, USA) за предоставленные для работы конструкции рGS/CMV/BChE и рRc/RSV-rQ45.*

*Работа поддержана РФФИ (грант № 10-04-00673-а), ФЦП (государственный контракт № 2046.2012.4) научной школы «Химические основы биокатализа», Программой Президиума РАН № 24 «Нанотехнологии и наноматериалы» и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере – программа «УМНИК».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jbilo O., L'Hermite Y., Talsa V., Toutant J.P., Chatonnet A. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 225. P. 115–124.

2. Mesulam M. // Neuroscience. 2002. V. 110. P. 627–639.

3. Saxena A., Sun W., Fedorko J.M., Koplovitz I., Doctor B.P. // Biochem. Pharmacol. 2011. V. 81. P. 164–169.

4. Lockridge O., Schopfer L.M., Winger G., Woods J.H. // *J. Med. Chem. Biol. Radiol. Def.* 2005. V. 3. P. 1–23.
5. Raveh L. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997. V. 145. P. 43–53.
6. Masson P., Rochü D. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. № 1. P. 68–78.
7. Masson P., Nachon F., Broomfield C.A., Lenz D.E., Verdier L., Schopfer L.M., Lockridge O. // *Chem. Biol. Interact.* 2008. V. 175. P. 273–280.
8. Lockridge O., Bartels C.F., Vaughan T.A., Wong C.K., Norton S.E., Johnson L.L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 549–557.
9. Lenz D.E., Yeung D., Smith J.R., Sweeney R.E., Lumley L.A., Cerasoli D.M. // *Toxicology.* 2007. V. 233. P. 31–39.
10. Masson P., Carletti E., Nachon F. // *Protein Pept. Lett.* 2009. V. 16. P. 1215–1224.
11. Geyer B.C., Kannan L., Cherni I., Woods R.R., Soreq H., Mor T.S. // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 873–886.
12. Masson P., Adkins S., Pham-Trong P., Lockridge O. // *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions. Expression and refoldin of functional human butyrylcholinesterase in E. coli.* N.Y.: Plenum Press, 1992.
13. Kishnani P.S., Corzo D., Nicolino M., Byrne B., Mandel H., Hwu W.L., Leslie N., Levine J., Spencer C., McDonald M., et al. // *Neurology.* 2007. V. 68. P. 99–109.
14. 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. // *N. Engl. J. Med.* 1990. V. 323. P. 1800–1805.
15. White G.C., Beebe A., Nielsen B. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 78. P. 261–265.
16. Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M., Fischer J.S., Goodkin D.E., Granger C.V., Simon J.H., et al. // *Ann. Neurol.* 1996. V. 39. P. 285–294.
17. Barngrover D. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 95. P. 280–282.
18. Tabuchi H., Sugiyama T., Tanaka S., Tainaka S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 107. P. 998–1003.
19. Porter A.J., Dickson A.J., Racher A.J. // *Biotechnol. Progr.* 2010. V. 26. P. 1446–1454.
20. Strnad J., Brinc M., Spudić V., Jelnikar N., Mirnik L., Carman B., Kravanja Z. // *Biotechnol. Progr.* 2010. V. 26. P. 653–663.
21. Mizushima S., Nagata S. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5322.
22. Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Häsler K., Fleckenstein B., Schaffner W. // *Cell.* 1985. V. 41. P. 521–530.
23. Nachon F., Nicolet Y., Viguié N., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Lockridge O. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 630–637.
24. Li H., Schopfer L.M., Masson P., Lockridge O. // *Biochem. J.* 2008. V. 411. P. 425–432.
25. Altamirano C.V., Lockridge O. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 13414–13422.
26. Huang Y.-J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., Touati M., Turcotte C., Valeanu L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13603–13608.
27. Geyer B.C., Kannan L., Garnaud P.-E., Broomfield C.A., Cadieux C.L., Cherni I., Hodgins S.M., Kasten S.A., Kelley K., Kilbourne J., Oliver Z.P., Otto T.C., Puffenberger I., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 20251–20256.
28. Freshney R.I. *Culture of animal cells.* Oxford, N.Y.: Wiley-Blackwell, 2005. P. 642.
29. Duysen E.G., Bartels C.F., Lockridge O. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. V. 302. P. 751–758.
30. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
31. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
32. Schlesinger N., Baker D.G., Schumacher H.R. // *J. Rheumatol.* 1997. V. 24. P. 1018–1019.
33. Harlow E., Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
34. Ausubel F.M. // *Current Protocols.* 2002. Unit 2.7.
35. Ellman G.L., Courtney K.D., Anders V., Feather-Stone R.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. P. 88–95.
36. Karnovsky M.J., Roots L. // *J. Histochem. Cytochem.* 1964. V. 12. P. 219–221.
37. Xie W., Altamirano C.V., Bartels C.F., Speirs R.J., Cashman J.R., Lockridge O. // *Mol. Pharmacol.* 1999. V. 55. P. 83–91.
38. Bartels C.F., Jensen F.S., Lockridge O., van der Spek A.F., Rubinstein H.M., Lubrano T., La Du B.N. // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 50. P. 1086–1103.
39. Wang Y., Boeck A.T., Duysen E.G., van Keuren M., Saunders T.L., Lockridge O. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004. V. 196. P. 356–366.
40. Preininger A., Schlokot U., Mohr G., Himmelspach M., Stichler V., Kyd-Rebenburg A., Plaimauer B., Turecek P.L., Schwarz H.P., Wernhart W., Fischer B.E., Dorner F. // *Cytotechnology.* 1999. V. 30. P. 1–15.
41. Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 31603–31607.
42. Jossé L., Smales C.M., Tuite M.F. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 105. P. 556–566.
43. Meleady P., Henry M., Gammell P., Doolan P., Sinacore M., Melville M., Francullo L., Leonard M., Charlebois T., Clynes M. // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 2611–2624.
44. Roncarati R., Seredenina T., Jow B., Jow F., Papini S., Kramer A., Bothmann H., Dunlop J., Terstappen G.S. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2008. V. 6. P. 181–193.
45. Chilukuri N., Sun W., Naik R.S., Parikh K., Tang L., Doctor B.P., Saxena A. // *Chem. Biol. Interact.* 2008. V. 175. P. 255–260.
46. Jain S., Hreczuk-Hirst D.H., McCormack B., Mital M., Epentetos A., Laing P., Gregoriadis G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1622. P. 42–49.

УДК 577.21

# Overexpression of MRPS18-2 in Cancer Cell Lines Results in Appearance of Multinucleated Cells

Z. Shevchuk<sup>1</sup>, M. Y. Yurchenko<sup>2</sup>, S. D. Darekar<sup>1</sup>, I. Holodnuka-Kholodnyuk<sup>3</sup>, V. I. Kashuba<sup>4</sup>, E. V. Kashuba<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm, 17177, Sweden

<sup>2</sup>Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NASU, 45 Vasylkivska str., Kyiv-22, 03022, Ukraine

<sup>3</sup>Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradins University, 5 Ratsupites, Riga, LV-1067, Latvia

<sup>4</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, 150 Zabolotnogo str., Kyiv-143, 03680, Ukraine

\*E-mail: Elena.Kashuba@ki.se

Received 01.10.2012

**ABSTRACT** Human mitochondrial ribosomal protein MRPS18-2 (S18-2) is encoded by a cellular gene that is located on the human chromosome 6p21.3. We have discovered that overexpression of the S18-2 protein led to immortalization and de-differentiation of primary rat embryonic fibroblasts. Cells showed anchorage-independent growth pattern. Moreover, pathways characteristic for rapidly proliferating cells were upregulated then. It is possible that the S18-2 overexpression induced disturbance in cell cycle regulation. We found that overexpression of S18-2 protein in human cancer cell lines led to an appearance of multinucleated cells in the selected clones.

**KEY WORDS** Mitochondrial ribosomal protein S18-2 (MRPS18-2), multinucleated cells, cancer cell line, cell cycle, RB binding protein.

## INTRODUCTION

Mitochondrial ribosomal protein S18-2 (MRPS18-2, NP\_05476, S18-2 in the text) is encoded by a cellular gene located on human chromosome 6p21.3. S18-2 cDNA was cloned after analysis of the differentially expressed genes in CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells [1]. Human genome contains three different S18 genes, in contrast to two in *C. elegans* and one in bacteria [2, 3]. The proteins of the S18 family are localized on the surface of the small subunit (28S) of the mammalian mitochondrial ribosome [3]. The function of these proteins is largely unknown.

Recently we have shown that overexpression of the human mitochondrial ribosomal protein S18-2 led to immortalization of primary rat embryonic fibroblasts, REFs [4]. Cells of the derived cell line named 18IM lost contact inhibition. Moreover, they acquired the ability for anchorage-independent growth in soft agar with a high cloning efficiency (more than 90%). Immortalized 18IM cells expressed the embryonic stem cell markers SSEA-1, Sox2, and Oct4 that were not detected in the original REFs. Noteworthy, the 18IM cells lost the expression of mesodermal markers like vimentin and

smooth-muscle actin. Part of them expressed ecto- and endoderm-specific pan-keratin, ectoderm-specific beta-III-tubulin, and mesoderm-specific MHC class II markers; some of the cells differentiated into fat cells in confluent cultures. The 18IM cells produced excessive amounts of pyruvate, suggesting an enhanced ATP synthesis. Moreover, as was shown by microarray analysis and Q-PCR, many genes encoding enzymes that are involved in the redox reactions, such as ATP synthases, mitogen activated kinases, and NADH dehydrogenases, are greatly upregulated in the immortalized cells [5]. Pathways of oxidative phosphorylation, ubiquinone biosynthesis, PI3K/AKT signaling, and fatty acid elongation in mitochondria, characteristic for rapidly proliferating cells, were also upregulated in the 18IM cells.

Earlier we have found that S18-2 specifically binds to retinoblastoma protein, RB [6]. S18-2 competes with E2F1 for the RB binding, thus S18-2 might play a role in the control of G<sub>1</sub>-S phase transition [7].

In the present work we show that overexpression of S18-2 in human tumor cell lines MCF7 and KRC/Y leads to the appearance of multinucleated cells.

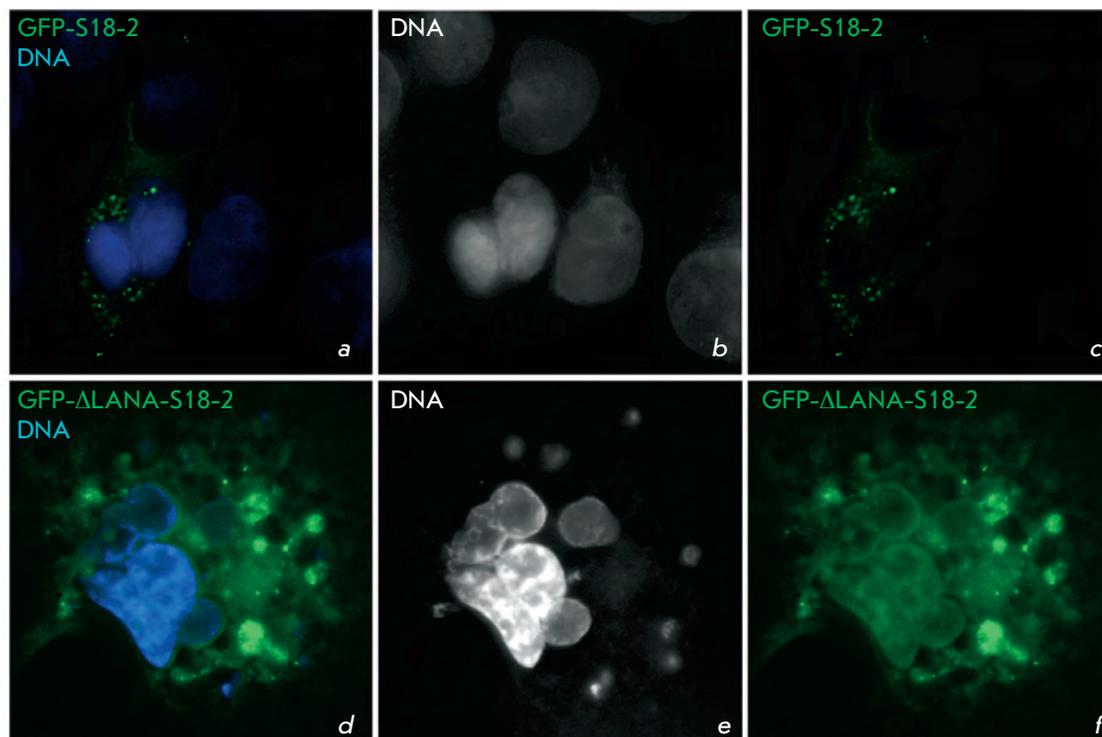


Fig. 1. Cellular localization of GFP-S18-2 (panels a–c) and GFP- $\Delta$ LANA-S18-2 (panels d–f) in the transfected MCF7 (top row) and KRC/Y (bottom row) cells. Note that in all transfected cells the exogenous S18-2 protein (panels a, c, d, and f) is localized in the cytoplasm

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plasmids

Cloning of S18-2 cDNA into pEGFPC-1 and pCMV-Tag3A (c-myc-tagged) vectors was described earlier [7]. S18-2 cDNA was also cloned in the pEGFPC-1 vector, coding for a fusion protein GFP- $\Delta$ LANA-S18-2, with the first 35 amino acids of LANA, encoded by human herpes virus 8 (HHV8, Kaposi sarcoma associated herpes virus) at the 5' end. The sequence was verified by direct sequencing, using commercial forward and reverse primers (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) and Applied Biosystems sequencer (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

### Antibodies

The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-c-myc (clone 9E10, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), anti-BrdU (Becton Dickinson (BD), San Jose, CA, USA), and anti-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); rabbit anti-S18-2 serum (described in [7]) and anti-MRPS18B (Proteintech Group inc, Chicago, IL, USA), and FITC-conjugated swine anti-rabbit and rabbit anti-mouse (Dako, Glostrup, Denmark).

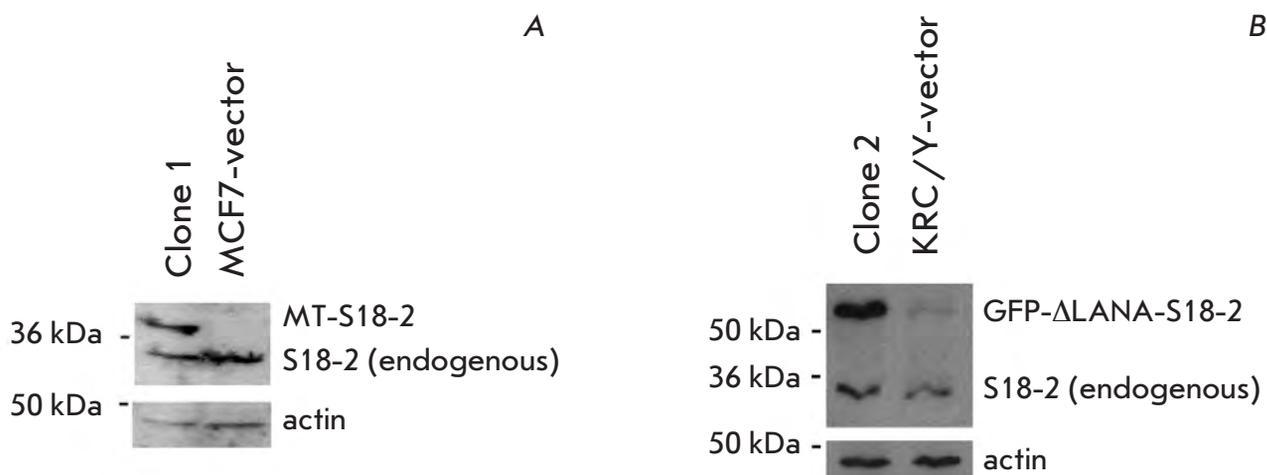
### Cells, cell culture, immunostaining and imaging

MCF7 breast carcinoma and KRC/Y renal carcinoma cell lines were cultured at 37°C in Iscove's medium

that contained 10% fetal bovine serum and appropriate antibiotics (penicillin (100  $\mu$ U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml)). Periodic staining with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) monitored the absence of mycoplasma. Prior to transfection experiments, the cells were grown on coverslips. The MCF7 cells were transfected with GFP- and c-myc-tagged constructs (GFP-S18-2 and MT-S18-2, correspondingly) and the KRC/Y cells were transfected with GFP- $\Delta$ LANA-S18-2 construct, in parallel with empty vectors, using Lipofectamine and Plus Reagent (Life Technology, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. Immunostaining and digital image capturing was performed as described elsewhere. Briefly, cells on coverslips were fixed in 1 : 1 mixture of cold methanol and acetone ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). After re-hydration in phosphate-buffered saline (PBS), cells were stained with antibodies. Hoechst 33258 was added at the concentration of 0.4  $\mu$ g/ml for DNA staining. Images were captured using DAS microscope Leitz DM RB with a Hamamatsu dual mode cooled charge-coupled device (CCD) camera (C4880; Hamamatsu, Japan).

### Cell cycle analysis by flow cytometry.

One million of living cells were labeled with bromodeoxyuridine (BrdU, 30  $\mu$ M) for 30 min at 37°C, trypsinized, collected, and fixed in ethanol (75% in PBS) at 4°C for at least 10 hours. After this, the cells were treated with pepsin (1 mg/ml in 30 mM HCl) for 30 min at 37°C and



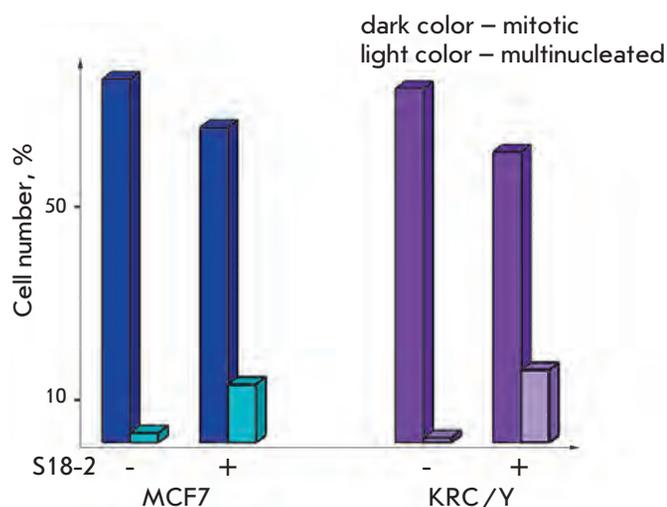
**Fig. 2.** A constitutive expression of S18-2 protein in the MCF7 and KRC/Y cells as compared to vector-transfected cells. The membrane was probed with anti-S18-2 rabbit serum and mouse anti-actin antibodies. Secondary antibodies (sheep anti-rabbit and anti-mouse horse radish peroxidase conjugated, GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) and Enhanced chemiluminescence kit (GE-Healthcare) were used to monitor protein bands. *A*, transfection of MCF7 cells with MT-S18-2 plasmid; *B*, transfection of KRC/Y cells with GFP-ΔLANA-S18-2 plasmid. Note the expression of endogenous S18-2 protein in all cells

with 2 M HCl for 15 min. The cell were labeled with anti-BrdU and FITC-conjugated rabbit anti-mouse antibodies and stained with propidium iodide (25 μg/ml in PBS). Cells (1 × 10<sup>4</sup>) were analyzed by flow cytometry, using a FACScan flow cytometer (BD), and the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined with the help of CellQuest software (BD).

## RESULTS AND DISCUSSION

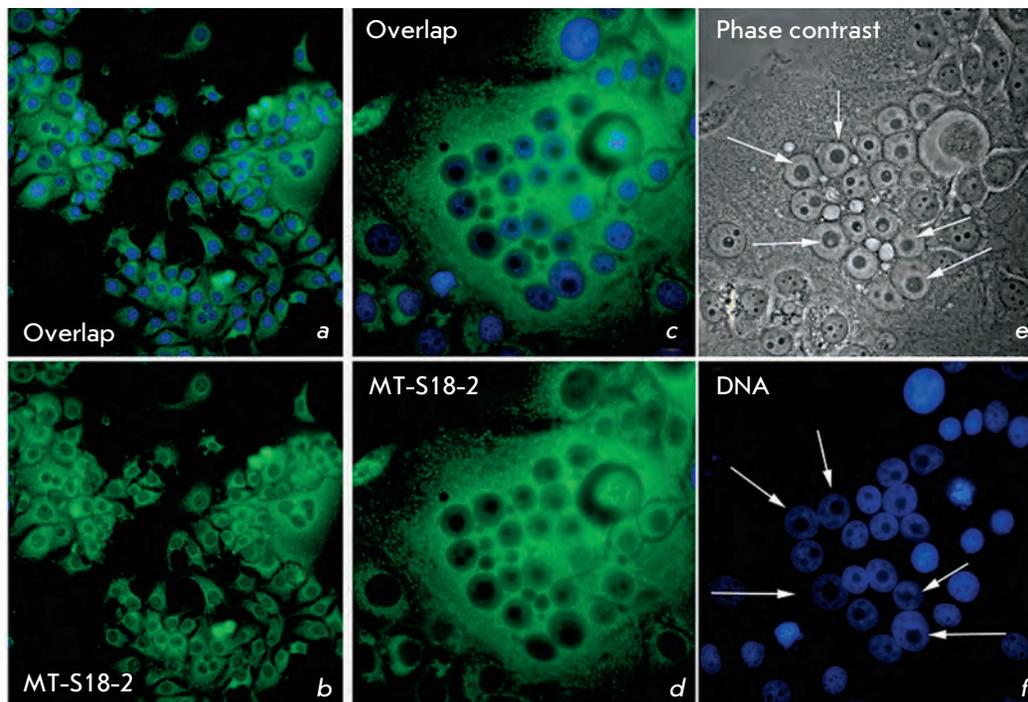
### Establishment of MCF7 and KRC/Y sub-lines, expressing S18-2 constitutively

Cells were grown in 6-well-plates prior transfection. 5 μg of MT-S18-2 or GFP-ΔLANA-S18-2 plasmid was used for transfection. MT-S18-2 and GFP-S18-2 signal was observed in the cytoplasm of the transfected MCF7 cells (*Fig. 1*, the top row, panels *a* and *c*). Earlier we have shown that GFP-S18-2 could be targeted to the nucleus upon cell transformation [4]. In order to achieve a nuclear localization of S18-2, its cDNA was cloned in the GFP-ΔLANA fusion vector that contained the first 35 amino acids of LANA, the HHV8-encoded latent nuclear antigen. It was shown that N-terminus of LANA binds to histones H2A and H2B to tether a HHV8 episome to a chromosome [8]. Despite that, the GFP-ΔLANA-S18-2 fusion protein was observed mainly in the cytoplasm of KRC/Y cells (*Fig. 1*, the lower row, panels *d* and *f*). 48 hours after transfection the cells were transferred to a Petri dish (7.5 cm in diameter) and the selective medium that contained 2 mg/ml



**Fig. 3.** MCF7 and KRC/Y cell cultures, expressing exogenous S18-2 constitutively, show a high proportion of multinucleated cells. Dark-color bars represent the percentage of mitotic cells and light-color bars, percentage of multinucleated cells in the culture

G418 was applied. Three weeks later, some of the clones that had survived (12 clones for MT-S18-2 and GFP-ΔLANA-S18-2 plasmids) were isolated and analyzed by Western blotting and immunostaining. Three clones of MCF7 and four clones of KRC/Y expressed exogenous S18-2 at a high level. For the further study, clone 1 of



**Fig. 4.** Multinucleated cells in the MCF7 cell culture expressing S18-2 constitutively. The percentage of multinucleated cells is shown in panels a and b (20×). At higher magnification (63×), large single nucleoli in multinucleated cells can be seen (panels c–f). Signal of MT-S18-2 fusion protein stained with anti-c-myc antibody is shown in green; DNA is stained blue

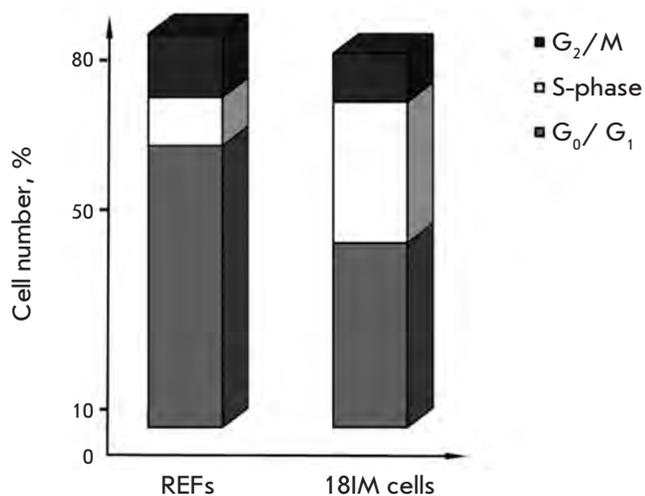
MCF7 and clone 2 of KRC/Y were selected (*Fig. 2A and B*). Noteworthy, the endogenous S18-2 was expressed at low levels in both cell lines.

**MT-S18-2 overexpression leads to the appearance of multinucleated cells**

MCF7-clone 1 and KRC/Y-clone 2 cells that expressed S18-2 constitutively, along with vector-transfected cells, were passaged for more than 20 population doublings. We have observed an extremely high frequency of multinucleated cells (*Fig. 3*). Approximately 12% of MCF7 cells and 15% of KRC/Y cells that expressed exogenous S18-2 protein at a high level, were multinucleated. Such cells were observed after sequential freezing and thawing of the culture. Noteworthy, the nucleoli in multinucleated cells were enlarged (*Fig. 4*, panels c, e, and f), suggesting an enhanced protein synthesis.

In order to investigate a possible mechanism of multinucleated cell formation, we analyzed the cell cycle distribution in 18IM cells. The percentage of cells in S-phase was much higher in 18IM cells than that in REFs (*Fig. 5*). A corresponding reduction in the cell number in G<sub>1</sub>-phase was also observed. A smaller number of cells in G<sub>2</sub>/M phase in 18IM cell culture may suggest that S18-2 protein, when expressed at a high level, leads to elevated transcription/translation, causing impaired mitosis.

How the mitochondrial ribosomal protein S18-2 can influence cell cycle regulation? Actually, it is well



**Fig. 5.** Cell cycle distribution in 18IM cells and control primary fibroblasts (REFs). The percentage of cells in S-phase is clearly elevated in 18IM cells, suggesting the deregulation of cell cycle upon the S18-2 overexpression

known that a crucial role in the G<sub>1</sub>/S checkpoint control is performed by retinoblastoma protein (RB) [9]. A hypo-phosphorylated form of RB binds to E2F1-5 transcription factors and prevents the S-phase entry. Hyper-phosphorylation of RB results in freeing of E2F1-5 and activation of the E2F-dependent transcription. As we mentioned earlier, we have found that S18-

2 protein binds to RB and frees E2F1 from inhibitory complexes with RB, inducing the S-phase [6, 7]. It may explain the increased number of cells in S-phase (Fig. 5) and, eventually, the formation of multinucleated cells.

There could be other mechanisms leading to a creation of cells with more than one nucleus. For example, enhanced expression of nucleoporin (Nup153, NP\_005115) led to the appearance of multinucleated HeLa cells, due to its binding to the MAD1 protein controlling mitotic spindle-assembly checkpoint [10]. Another example of similar action is overexpression of BCSG1 protein (gamma-synuclein, NP\_003078) in breast cancer cell lines, leading to inactivation of BubR1 regulating mitotic checkpoint [11]. Can S18-2 influence the cell division due to its binding to proteins controlling a mitotic pole formation? This question has no answer yet, however. There are more than 70 mitochondrial ribosomal proteins encoded by the human genome (for review see [12]), and their functions are largely unknown. Some studies suggested multiple functions of ribosomal proteins in mammalian cells. It was shown, for example, that MRPS29, one of the proteins of the

small mitochondrial ribosome subunit, is not only involved in the ribosome assembly but can also induce apoptosis [13, 14]. The mitochondrial ribosomal protein of large subunit, L41 (MRPL41), can induce G<sub>1</sub> arrest [15, 16]. To further explore the functions of S18-2, we are currently looking for S18-2 binding proteins.

### CONCLUSIONS

We have shown that overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18-2 in human cancer cell lines, MCF7 and KRC/Y, results in the appearance of multinucleated cells. This can be due to the enhanced transcription/translation and, probably, impaired mitosis. Further studies should be performed to analyze the presented phenomenon. ●

*This work was supported by the Swedish Cancer Society, by matching grants from the Concern Foundation (Los Angeles) and the Cancer Research Institute (New York), by the Swedish Institute, Karolinska Institutet Research Foundation and by Lilian Sagens & Curt Eriksson Research Foundation.*

### REFERENCES

- Zhang Q.H., Ye M., Wu X.Y., Ren S.X., Zhao M., Zhao C.J., Fu G., Shen Y., Fan H.Y., Lu G. // Genome Research. 2000. V. 10. № 10. P. 1546–1560.
- Suzuki T., Terasaki M., Takemoto-Hori C., Hanada T., Ueda T., Wada A., Watanabe K. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 35. P. 33181–33195.
- Cavdar Koc E., Burkhart W., Blackburn K., Moseley A., Spremulli L.L. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 22. P. 19363–19374.
- Kashuba E., Pavan Yenamandra S., Deoram Darekar S., Yurchenko M., Kashuba V., Klein G., Szekely L. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. V. 106. № 47. P. 19866–19871.
- Yenamandra S.P., Darekar S.D., Kashuba V., Matskova L., Klein G., Kashuba E. // Cell Death Dis. 2012. V. 3. e357.
- Snopok B., Yurchenko M., Szekely L., Klein G., Kashuba E. // Anal. and Bioanal. Chem. 2006. V. 386. № 7–8. P. 2063–2073.
- Kashuba E., Yurchenko M., Yenamandra S.P., Snopok B., Isagulians M., Szekely L., Klein G. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. V. 105. № 14. P. 5489–5494.
- Barbera A.J., Chodaparambil J.V., Kelley-Clarke B., Luger K., Kaye K.M. // Cell Cycle. 2006. V. 5. № 10. P. 1048–1052.
- Classon M., Harlow E. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. № 12. P. 910–917.
- Lussi Y.C., Shumaker D.K., Shimi T., Fahrenkrog B. // Nucleus. 2010. V. 1. № 1. P. 71–84.
- Gupta A., Inaba S., Wong O. K., Fang G., Liu J. // Oncogene. 2003. V. 22. № 48. P. 7593–7599.
- O'Brien T.W. // IUBMB Life. 2003. V. 55. № 9. P. 505–513.
- Saini N., Balhara J., Adlakha Y.K., Singh N. // Int. J. Integ. Biol. 2009. V. 5. № 5. P. 49–57.
- Khanna N., Sen S., Sharma H., Singh N. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 30. № 1. P. 26–35.
- Kim M.J., Yoo Y.A., Kim H. J., Kang S., Kim Y.G., Kim J.S., Yoo Y.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 338. № 2. P. 1179–1184.
- Yoo Y.A., Kim M.J., Park J.K., Chung Y.M., Lee J.H., Chi S.G., Kim J.S., Yoo Y.D. // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. № 15. P. 6603–6616.

УДК 579.[25+64]:575.17:632.9

# Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК, *gyrB* и методов АР-ПЦР и saAFLP

Н. В. Пунина<sup>1,2\*</sup>, В. С. Зотов<sup>1</sup>, А. Л. Пархоменко<sup>3</sup>, Т. Ю. Пархоменко<sup>3</sup>, А. Ф. Топунов<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Россия, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр РАМН, 115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1<sup>3</sup>Институт сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины, 95453, Украина, АР Крым, Симферополь, ул. Киевская, 150

\*E-mail: hin-enkelte@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2012

**РЕФЕРАТ** Группа *Bacillus cereus*, включающая в себя близкородственные виды бактерий, представляет большой интерес с биотехнологической, сельскохозяйственной и медицинской точек зрения. Однако дифференциация видов внутри данной группы и изучение их внутривидового разнообразия представляют сложную задачу, требующую комплексного решения. Бактерии вида *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) входят в состав группы *B. cereus*. В представленной работе изучена внутривидовая структура пяти энтомопатогенных штаммов и 20 изолятов *Bt*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи различных методов: анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrB*, АР-ПЦР (ВОХ- и ERIC-ПЦР) и разработанного нами метода saAFLP. Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrB* позволил выделить внутри группы *B. cereus* шесть подгрупп: *B. anthracis*, *B. cereus* I и II, *Bt* I, II и III, и подтвердить принадлежность изучаемых штаммов к роду *Bacillus*. Все штаммы были разделены на три группы, 17 из них отнесли к группе *Bt* II коммерческих, промышленных штаммов. Результаты, полученные методами АР-ПЦР (ВОХ и ERIC) и saAFLP, хорошо коррелировали друг с другом и с данными для генов 16S рРНК и *gyrB*. Все штаммы были объединены в пять групп. У штамма *Bt* 0376 р.о., применяющегося в производстве энтомопатогенного препарата «STAR-t», выявлен уникальный saAFLP-паттерн, который позволяет отличать его от других штаммов группы *Bt* II.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** группа *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, 16S рибосомная РНК, *gyrB*, saAFLP, таксономия, филогения.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** *Bt* – *Bacillus thuringiensis*; ICP – δ-эндотоксин; MLST (multilocus sequence typing) – мультилокусное типирование последовательностей; MEE (multilocus enzyme electrophoresis) – мультилокусный электрофорез ферментов; saAFLP, AFLP (single adapter amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, полученных с применением одного адаптера; RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов; АР-ПЦР (arbitrarily primed polymerase chain reaction) – полимеразная цепная реакция со случайными праймерами; реп-ПЦР (repetitive sequence-based PCR) – полимеразная цепная реакция с праймерами на повторяющиеся элементы; ВОХ, ERIC – повторяющиеся элементы ДНК; ME (minimum evolution) – метод минимальной эволюции; NJ (neighbour joining) – метод связывания ближайших соседей.

## ВВЕДЕНИЕ

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) – грамположительные бактерии, обладающие биоинсектицидной активностью, обусловленной их способностью в процессе споруляции продуцировать комплекс кристаллических бел-

ковых токсинов, называемых также δ-эндотоксинами (ICP), или Cry-белками [1]. Эти токсины активны в отношении широкого ряда видов и родов насекомых, в том числе вредителей сельскохозяйственной продукции и паразитов человека [2, 3]. Благодаря

высокой специфичности  $\delta$ -эндотоксинов энтомопатогенные бактерии вида *Bt* могут заменять собой пестицидные средства и широко применяются при создании биотехнологических препаратов для защиты урожая [4, 5].

На основании фенотипического и генотипического анализа вид *Bt* был отнесен к группе *B. cereus*. Эта группа включает также близкородственные виды *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*. Виды *B. cereus* и *Bt* невозможно различить при помощи морфологических [6], фенотипических [7] и генетических методов [8–11]. Предполагается, что эти виды могут представлять собой один общий вид *B. cereus sensu lato* [12, 13]. Поскольку данная группа близкородственных бактерий представляет большой интерес для сельского хозяйства и медицины, актуальным остается детальное изучение таксономии этих видов, а также создание инструментов и технологий для их дифференциации и выделения.

Традиционно вид *Bt* выделяли и разделяли на подвиды на основании наличия или отсутствия кристаллических ИСР и кодирующих их генов *cry* и *cty* [1, 3]. Однако этот метод имеет свои недостатки: гены ИСР располагаются на плазмиде, и бактерии в процессе конъюгации способны терять их, передавать другим штаммам *Bt* или близкородственным видам [14]. При помощи серологического анализа жгутиковых антигенов (Н-серотипирования) выявлено более 82 сероваров *Bt* [15, 16]. Однако эта классификация не всегда соответствовала истинным филогенетическим взаимоотношениям внутри данного вида [17–19].

Генетическое разнообразие бактерий *Bt* и возможность разделения двух видов *Bt* и *B. cereus* изучали с использованием различных методов: ДНК-ДНК-гибридизации [20], анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК, 23S рРНК, 16S–23S рРНК [8, 11], MLST [21], МЕЕ [12, 18], AFLP [22–24], RFLP [25], AP-ПЦР [26–29] и др. Однако эти методы также не позволили установить истинные филогенетические взаимоотношения среди *Bt*.

Цель данной работы заключалась в оценке применимости модифицированного нами метода геномного фингерпринтинга (saAFLP) для выявления филогенетических различий изолятов и штаммов *Bacillus* sp., выделенных в различных эколого-географических зонах Украины. Для определения таксономических отношений на уровне род-вид мы анализировали нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *gyrB*; для изучения структуры на внутривидовом уровне применяли метод saAFLP наряду с другими информативными методами (гер-ПЦР). Такая комплексная диагностика в совокуп-

ности с данными физиолого-биохимических тестов предоставляет большие возможности для изучения таксономической структуры близкородственных организмов. Однако следует отметить, что выборку штаммов *Bt* в дальнейшем нам будет необходимо расширить.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальные штаммы

В работе использовали пять энтомопатогенных штаммов и 20 изолятов бактерий *Bt*, обладающих уникальными биохимическими свойствами, из коллекций полезных микроорганизмов различных научных учреждений Украины и России (Института сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины, ИСХК НААН, Симферополь, АР Крым, Украина; Института сельскохозяйственной микробиологии Национальной академии аграрных наук, Чернигов; Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва). Пять штаммов из коллекции ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетики» использовали в качестве типовых. Изоляты из коллекции ИСХК НААН были выделены в разных эколого-географических зонах Украины.

### Выделение ДНК

Препараты суммарной клеточной ДНК выделяли из штаммов, которые культивировали на агаризованной среде ТУ (г/л): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 10.0; CaCl<sub>2</sub> – 0.4; агар – 20.0. ДНК выделяли из свежих культур на 1–2 сут роста с использованием метода сорбции на магнитных частицах (набор Минипреп, «Силекс», Россия).

### Фенотипическая характеристика

Морфологические и физиолого-биохимические характеристики чистых культур бактерий определяли, руководствуясь общей стратегией фенотипической дифференциации, описанной в руководствах «Определитель бактерий» [30], «Методы общей бактериологии» [31].

### ПЦР-амплификация и секвенирование гена 16S рРНК

ПЦР-анализ и последующее определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [32] проводили на генетическом анализаторе с использованием универсальных праймеров 27f (5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACSTTGTTACGACTT-3') [33]. Амплифицированные фрагменты детектировали при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле.

Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl ABI («Applied Biosystems», США).

#### ПЦР-амплификация и секвенирование гена *gyrB*

Ген *gyrB* амплифицировали и секвенировали с использованием ранее разработанных универсальных праймерных систем UP1 и UP2r [34], разработанных нами специфичных для рода *Bacillus* праймеров *gyrB\_F* (5'-CTTGAAGGACTAGARGCAGT-3') + *gyrB\_Rf* (5'-CCTTCACGAACATCYTCACC-3') и *gyrB\_Fr* (5'-GGTGARGATGTTTCGTGAAGG-3') + *gyrB\_R* (5'-TGGATAAAGTTACGACGYGG-3') и протокола. Температурно-временной профиль реакции был следующим: первоначальная денатурация при 94°C – 2 мин; затем 30 циклов: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 1 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C. Амплифицированные фрагменты выявляли при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl ABI («Applied Biosystems», США).

#### ПЦР с использованием праймеров к различным повторяющимся элементам (rep-ПЦР)

Для проведения rep-ПЦР использовали описанные ранее праймерные системы [26, 27]: ERIC1R 5'-ATGTAAGTCTCCTGGGGATTCCAG-3'; ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'.

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси: 1× буфер для полимеразы BioTaq (17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>), 5 нМ dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, 12.5 пМ праймера и 1.25 ед. акт. BioTaq-ДНК-полимеразы («Диалат ЛТД», Россия). Температурно-временной профиль: первый цикл – 94°C, 2 мин; последующие 40 циклов – 94°C, 20 с; 40°C, 30 с и 72°C, 90 с; окончательная элонгация – 7 мин при 72°C. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при напряженности поля 6 В/см и документировали с использованием системы BioDoc Analyze («Biometra», Германия).

#### saAFLP-анализ [35]

Ранее мы модифицировали метод AFLP, разработанный и запатентованный Забеу и Восом [36], и в данной работе оценили его применимость для анализа близкородственных бактерий *Bt*. Ранее при помощи модифицированного нами метода saAFLP были успешно проанализированы филогенетические отношения близкородственных штаммов разных видов рода *Rhizobium* [35]. Процедура saAFLP состоит

из трех шагов: (i) одновременная обработка в одной пробирке экстрагированной ДНК бактерии с помощью одной из эндонуклеаз рестрикции (XmaJI, XbaI, PstI) и лигирование с одним одноцепочечным адаптером Ad.CTAG1; (ii) ПЦР-амплификация с одним праймером, комплементарным последовательности Ad.CTAG1; (iii) электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле. Принципиально новое в случае данного saAFLP – проведение рестрикционного анализа и лигазной реакции в одной пробирке, применение эндонуклеазы рестрикции XmaJI (XbaI, PstI) для изучения филогенетических отношений штаммов *Bt*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, а также применение одного одноцепочечного адаптера Ad.CTAG1.

Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, лигазный буфер («Fermentas», США), 10 пМ одноцепочечного адаптера Ad.CTAG1 (5'-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3'), 5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы («Fermentas», США) и 1 ед. акт. рестриктазы XmaJI (XbaI, PstI). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient Eppendorf в 25 мкл смеси, содержащей 1× буфер для ПЦР, 2.8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы – 2 мкл рестриктазно-лигазной смеси, 0.4 мкМ праймера Pr.CTAG1 (5'-CTGGAATCGATTCCAGctag-3'), комплементарного адаптеру и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы BioTaq («Диалат ЛТД», Россия). ПЦР-амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация – 94°C, 2 мин; затем 30 циклов – 94°C, 30 с; 40°C, 30 с; 72°C, 3 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C.

#### Анализ нуклеотидных последовательностей

Первичный сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, полученных в данной работе и представленных в базе данных GenBank, проведен при помощи программы NCBI Blast [37]. Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы CLUSTALW 1.75v. [38], проверку и редактирование – с помощью редактора BioEdit 7.0.5.3 [39] и Mega 3.1 [40]. Филогенетические деревья были построены в программе Mega 3.1 [40] при помощи методов объединения ближайших соседей (NJ) [41] и минимальной эволюции ME [42]. Статистическую значимость порядка ветвления полученных деревьев рассчитывали с использованием бутстрэп-анализа путем построения 1000 альтернативных реплик, или деревьев.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК часто применяется с целью таксономической локализации и идентификации рода/вида бактерий. Мы амплифицировали и секвенировали ПЦР-фрагменты гена 16S рРНК (размер секвенированной области составил 1386 п.н.) пяти типовых штаммов рода *Bacillus* и 20 изолятов из Украины, требующих подтверждения таксономической принадлежности к роду *Bacillus*. Аналогичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК *B. cereus*, *Bt*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США и использованы для сравнения. В качестве удаленных контролей при проведении филогенетического анализа были выбраны нуклеотидные последовательности *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*. По выровненным последовательностям при помощи алгоритма МЕ построено филогенетическое дерево, отражающее эволюцию анализируемого гена (рис. 1). Парные генетические расстояния рассчитывали с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетической структурой рода, установленной методом ДНК-ДНК-гибридизации [43] и полученной для группы *B. cereus* в результате анализа фрагментов 16S рРНК, 23S рРНК [8, 11] и межгенной области 16S–23S рРНК [44], реп-ПЦР [29] и AFLP [23].

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК подтвердил принадлежность изучаемых изолятов к роду *Bacillus*. Однако вследствие высокой консервативности последовательности гена 16S рРНК (99.7–100.0% гомологии) этот метод не позволяет достоверно выделить отдельные виды внутри группы *B. cereus*, что неоднократно отмечали и в других работах [8, 29].

Штаммы вида *B. anthracis*, хотя и были сгруппированы в единый кластер, однако с низкой степенью значимости. В этот кластер *B. anthracis* были помещены и штаммы *Bt*. Как и в работе Бавыкина и соавт. [45], мы выделили две группы *B. cereus* (I и II). Такое разделение не подтверждено статистически (статистическая значимость порядка ветвления < 50%). Группа *B. cereus* I включала в себя патогенный штамм *B. cereus* ATCC 14579<sup>T</sup> и целый ряд непатогенных сероваров *Bt*. Группа *B. cereus* II состояла из различных сероваров *Bt* и непатогенного штамма *B. cereus* ATCC 10987<sup>T</sup>. Большинство штаммов *Bt* с низким уровнем значимости ветвления формировали единый кластер,

объединяющий различные серовары этого вида. В отдельную подгруппу были сгруппированы штаммы видов *B. mycoides* и *B. weihenstephanensis*.

Штаммы, представляющие коммерческую ценность, а также типовой штамм *Bt ser. berliner* ATCC 10792<sup>T</sup>, были объединены в группу *Bt* II со значимостью ветвления 56%. К этой группе отнесли 17 изучаемых нами украинских изолятов различных серотипов, выделенных из различных насекомых-хозяев в основном в Луганской и Херсонской областях, а также в Красногвардейском и Симферопольском районах. Штамм *Bt* 0376 р.о. (серотип 1), предложенный для производства экологически безопасного энтомопатогенного препарата «STAR-t» (ООО «Симбитор»), предназначенного для регуляции численности личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), картофельной моли (*Phthorimea operculella* Zel.) и нуттового минера (*Liriomiza cicerina* Rd.) во время вегетации и хранения картофеля и нута, был отнесен к данной группе и имел группоспецифические замены А/Г77, Т/С90, Т/А92, С/Т192, С/А1015 в гене 16S рРНК. Все исследованные нами изоляты группы *Bt* II имели полностью идентичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК. Штамм *Bt var. thuringiensis* 994 (серотип 1, аналог биоагента препарата Битоксибациллин), применяемый для производства препарата «Акбитур», штамм *Bt* 408 (серотип 3), проявляющий высокую энтомопатогенную активность в отношении *L. decemlineata*, и штамм *Bt var. darmstadiensis* Н10 (Х серотип) также вошли в группу *Bt* II.

Штаммы *Bt* 836 (серотип 4), *Bt var. kurstaki* 0293 (серотип 3, аналог штамма-биоагента препарата Лепидоцид) и *Bt var. morrisoni* 109 (серотип Х) были отнесены к группе *Bt* I. Внутри каждой группы найдены как специфические нуклеотидные замены, характерные для каждой из групп, так и случайные. У *B. anthracis* нашли 16 замен; у *B. cereus* I – 30; у *B. cereus* II – 32; у *Bt* I – 28; у *Bt* II – 21. Однако следует отметить, что большинство нуклеотидных замен носило случайный характер, они были штаммоспецифичными.

Таким образом, ген 16S рРНК не может использоваться для оценки и изучения филогении на уровне ниже рода и вида *Bt*, так как не позволяет выделить нуклеотидные замены, специфичные для отдельных видов данной группы.

Генетическое разнообразие последовательностей гена *gyrB*

В таксономических исследованиях и для идентификации бактерий наряду с геном 16S рРНК применяют нуклеотидную последовательность гена *gyrB* [34]. В настоящее время опубликован ряд работ, в которых

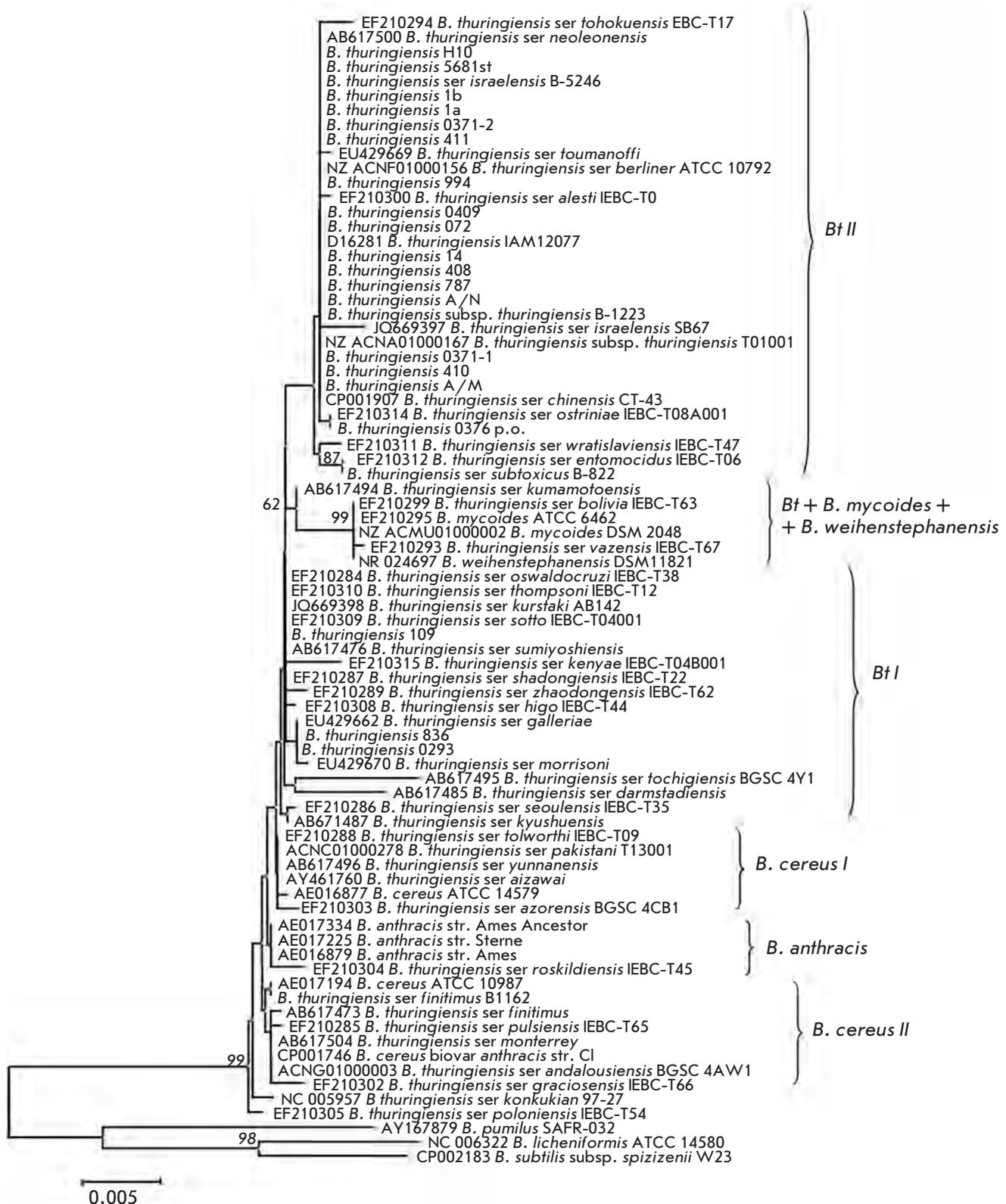


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий рода *Bacillus*, построенное по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК с использованием алгоритма ME. Масштаб соответствует 0.5 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев

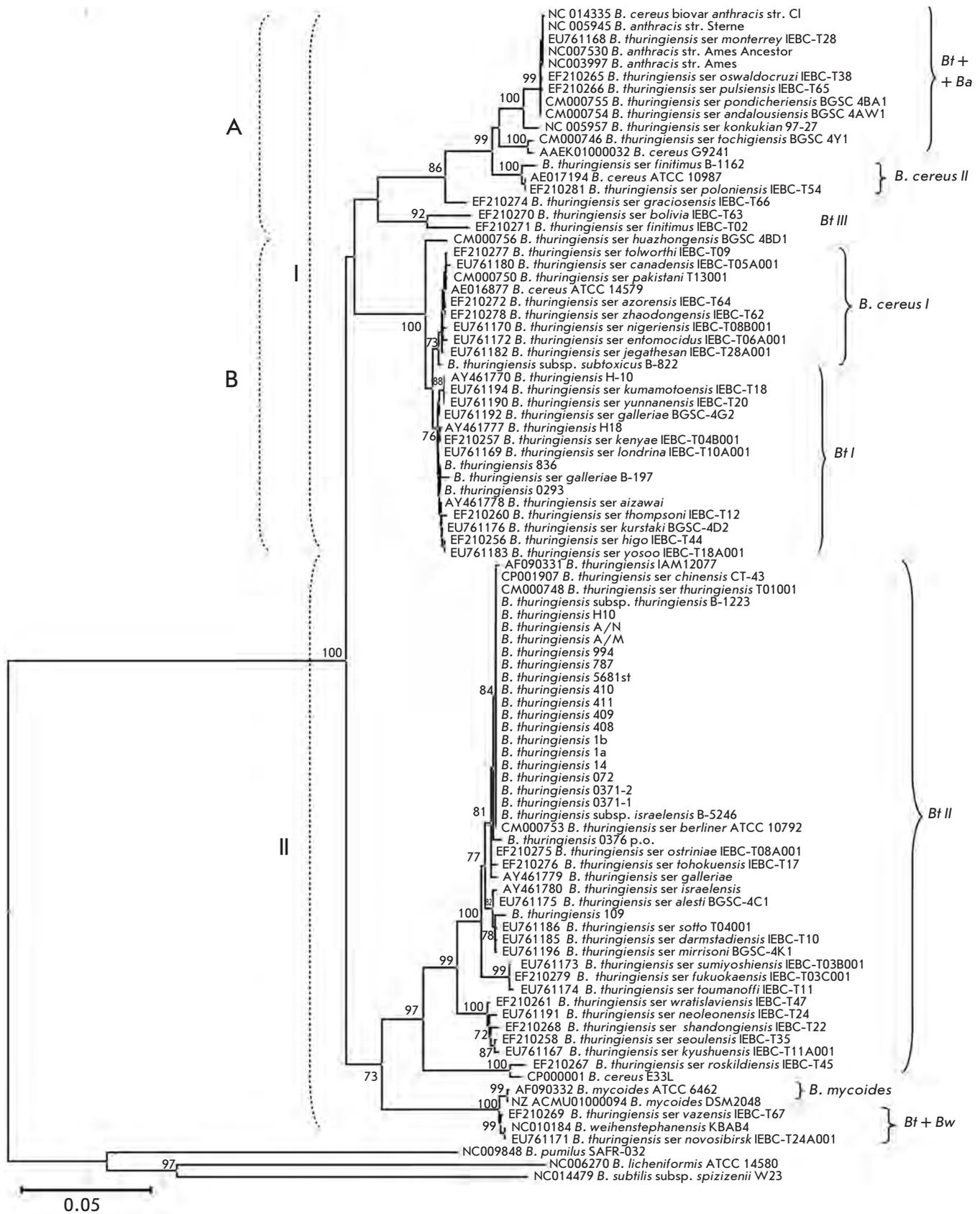


Рис. 2. Филогенетическое дерево бактерий группы *B. cereus*, построенное по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*, с использованием алгоритма МЕ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 п.н. Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев

изучали изменчивость последовательности данного гена у различных видов бактерий рода *Bacillus* (например, *B. subtilis* [46], группы *B. cereus* [47]). С помощью предложенных ранее универсальных праймеров [34] и созданных нами праймерных систем, специфичных для 3'-конца гена *gyrB* бактерий группы *B. cereus*, амплифицировали и секвенировали ПЦР-фрагменты гена (размер секвенированной области составил 1800 п.н., 81.82% всего гена). Этот фрагмент гена *gyrB* выбран нами на основании распределения уровня полиморфизма (энтропии) нуклеотидной последовательности гена с помощью программного обеспечения DNAsp v. 5 [48]. Уровень полиморфизма был выше среднего на участках 150–700 и 1650–2000 п.н. от начала гена (данные не представлены). Однако вследствие ограниченного количества представленных в GenBank последовательностей гена *gyrB* штаммов группы *B. cereus* данной длины для анализа мы выбрали участок с 385 по 1507 п.н. от начала гена (аннотация дана для штамма *Bt ser. berliner* ATCC 10792<sup>T</sup>), что составило 60% общей длины гена. Для 25 изученных нами штаммов, изолятов и референсных последовательностей штаммов рода *Bacillus*, депонированных в GenBank, при помощи алгоритма ME построено филогенетическое дерево, представленное на *рис. 2*. В качестве удаленных контролей при проведении филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности видов *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*.

Топология построенного дерева имела значительное сходство с филогенетическими деревьями, полученными ранее для гена 16S рРНК и межгенного региона 16S–23S рРНК, и не зависела от применяемых для построения алгоритмов (NJ, ME). Выявлены межвидовые и внутривидовые различия между видом *B. anthracis* и группой *B. cereus* – *Bt*. Результаты проведенных исследований показали, что нуклеотидная последовательность гена *gyrB* обладает большей разрешающей способностью, чем последовательности генов 16S рРНК и межгенного региона 16S–23S рРНК [34, 46], и соответственно более пригодна для таксономического изучения близкородственных видов.

Как и в случае гена 16S рРНК, но с большей степенью значимости, внутри группы *B. cereus* можно выделить пять подгрупп: *B. anthracis*, *B. cereus* I и II, *Bt* I и II. На филогенетической кладограмме со статистической значимостью порядка ветвления 92% выделена еще одна группа – *Bt* III, в которую вошли штаммы *Bt ser. bolivia* IЕВС-Т63 и *Bt ser. finitimus* IЕВС-Т02. Большинство штаммов с высокой степенью значимости формировали группу штаммов *Bt* II, в которой также находились штаммы, применяемые в производстве энтомопатогенных препаратов. Однако, как и предполагалось, исходя из опубликован-

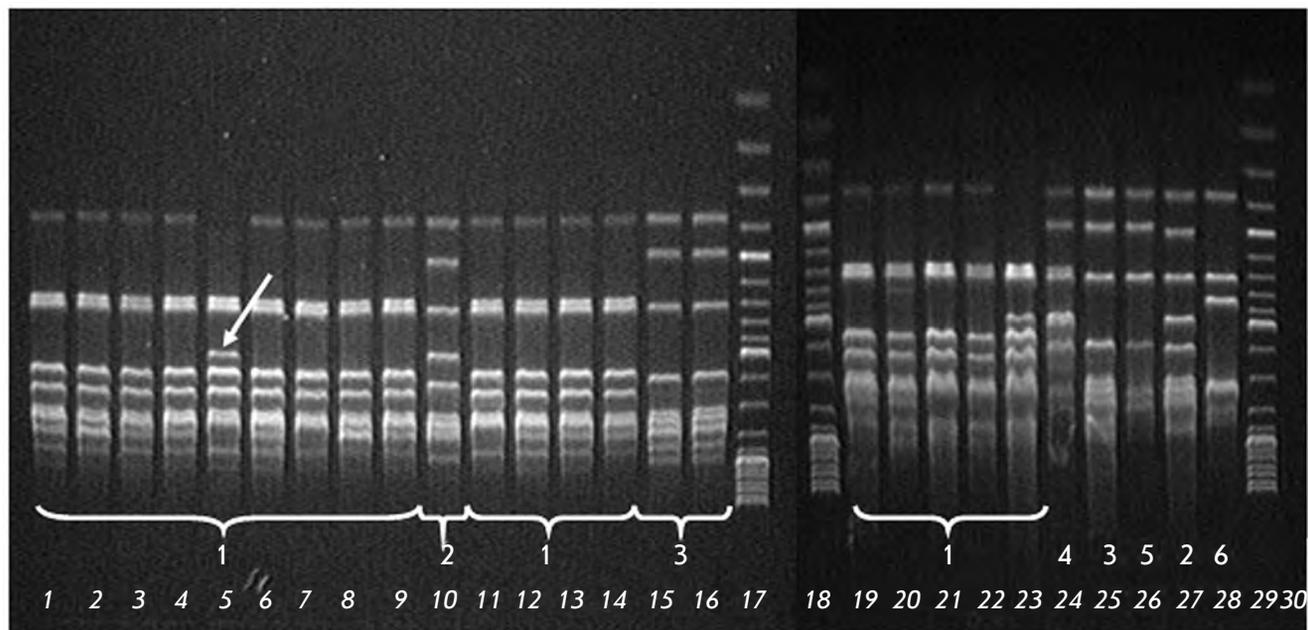
ных данных, различить между собой виды *B. cereus* и *Bt* не представлялось возможным [45]. Так, штаммы *Bt* были сгруппированы вместе со штаммами видов *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. weihenstephanensis* в подгруппы *B. anthracis*, *B. cereus* I и II и *B. weihenstephanensis*. Вследствие большей разрешающей способности и вариабельности нуклеотидной последовательности *gyrB* при сравнении последовательностей данного гена штамма *Bt* 0376 р.о. и других штаммов данной группы удалось выявить две специфические для данного штамма замены: А/Г861 и А/Г1149. В целом в группе *B. cereus* уровень сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей составил 87.1–95.2% и 95.1–99.2% соответственно.

Стоит отметить кластеризацию штаммов в две группы с высоким уровнем статистической значимости порядка ветвления. Кластер I образован группами А и В. Группа А объединила (достоверно сгруппированные) патогенные штаммы *B. anthracis*, непатогенный штамм *B. cereus* ATCC 10987<sup>T</sup> и энтомопатогенные штаммы *Bt ser. finitimus* В-1162 и *Bt ser. poloniensis* IЕВС-Т54 группы *B. cereus* II, энтомопатогенные штаммы группы *Bt* III. Группа В образована патогенным для человека штаммом *B. cereus* ATCC 14579<sup>T</sup>, энтомопатогенными штаммами *Bt* группы *B. cereus* I и энтомопатогенными штаммами группы *Bt* I. В кластер II вошли бактерии видов *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и группа *Bt* II, включающая большинство штаммов, применяющихся в промышленном производстве энтомопатогенных препаратов. Подобная кластеризация бацилл может свидетельствовать в пользу парафилетичной структуры как самой группы *B. cereus* в целом, так и отдельных ее видов.

#### Полиморфизм *Bt*, выявленный saAFLP и гер-ПЦР-маркерами

Для выявления различий между близкими видами и штаммами бактерий наряду с генами домашнего хозяйства применяют методы геномного фингерпринтинга. Наиболее часто применяется метод гер-ПЦР, основанный на использовании олигонуклеотидных праймеров, гомологичных последовательностям межгенных повторяющихся элементов различного типа. В нашей работе различия между близкородственными штаммами *Bt* выявляли при помощи гер-ПЦР (BOX-, ERIC-ПЦР) и saAFLP. Полученные результаты представлены на *рис. 3, 4*.

Все исследуемые нами штаммы анализировали методом saAFLP с применением трех эндонуклеаз рестрикции – XmaJI, XbaI и PstI. Информативные спектры для всех штаммов *Bt* получены только с использованием XmaJI. Метод saAFLP, модифициро-

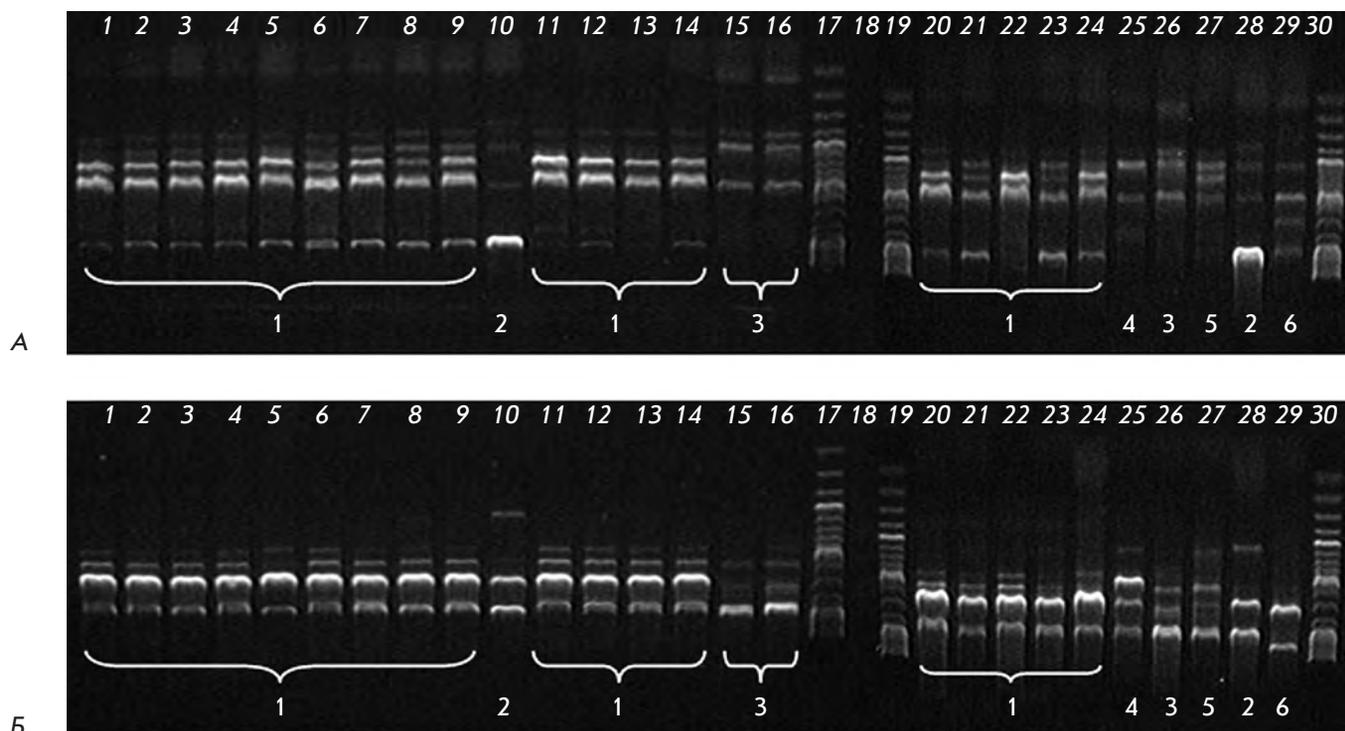


**Рис. 3.** Результаты электрофоретического анализа продуктов saAFLP на препаратах ДНК *Bt*. Дорожки 17, 18, 29 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК (1 kb ladder, «Fermentas»); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 р.о.; 6 – *Bt* 787; 7 – *Bt* 411; 8 – *Bt* 072; 9 – *Bt* 0371-1; 10, 27 – *Bt* 109; 11 – *Bt* 14; 12 – *Bt* 994; 13 – *Bt* 1b; 14 – *Bt* A/M; 15 – *Bt* 836; 16, 25 – *Bt* 0293; 20 – *Bt* subsp. *israelensis* B-5246; 21 – *Bt* 0371-2; 22 – *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223; 24 – *Bt* subsp. *subtoxicus* B-822; 26 – *Bt* subsp. *galleriae* B-197; 28 – *Bt* subsp. *finitimus* B-1162; 30 – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы

ванный нами, позволил различать штаммы на уровне вид-группа штаммов. Из результатов анализа видно, что полученные спектры разделили выборку штаммов *Bt* на шесть групп (рис. 3). Все штаммы относились к виду *Bt*, однако, предположительно, к разным подвидам. Группа 1 включала типовые штаммы *Bt* subsp. *thuringiensis*, а также *Bt* 0376 р.о. Этот штамм содержал уникальный saAFLP-фрагмент длиной 1000 п.н., отличающий его от других штаммов группы 1 (отмечен белой стрелкой на рис. 3). Группы 2, 3, 4, 5 представлены либо малым числом штаммов, либо одним штаммом. Следует отметить, что такое группирование соответствовало данным, полученным ранее с использованием генов 16S рРНК и *gyrB*. Важно, что каждая группа имела свой специфический спектр и saAFLP-фрагменты, отличающие ее от штаммов других групп. Удалось выявить маркеры, уникальные для отдельных штаммов, например, коммерческого штамма *Bt* 0376 р.о., отличающие его от всех штаммов группы 1. Таким образом, предлагаемый нами метод более специфичен и может использоваться для быстрого поиска специфических маркеров и изучения полиморфизма популяции.

В своей работе мы также использовали методы ERIC-ПЦР (рис. 4А) и BOX-ПЦР (рис. 4Б) для срав-

нения результатов, получаемых при помощи «стандартных» праймеров и при помощи разработанного нами saAFLP-анализа. На основании анализа полученных ERIC- и BOX-спектров все исследуемые штаммы *Bt* были разделены на шесть групп. Однако различий между ERIC- и BOX-спектрами штаммов внутри каждой группы не выявлено. Видно, что число специфических ПЦР-маркеров, а также общее количество фрагментов, получаемых методом saAFLP, больше, чем при использовании ERIC- и BOX-праймеров. Это свидетельствует в пользу более высокой чувствительности, специфичности и информативности метода saAFLP. Характер полученных результатов можно объяснить тем, что методы, в которых используются ERIC- и BOX-праймеры, позволяют анализировать отдельные участки генома, которые являются весьма консервативными (промоторные регионы (ERIC1R-ERIC2, BOX, REP2-I-REP1R-I), или область функциональных генов (например, тРНК), поэтому спектры, получаемые на основе таких праймеров, содержат общую, а не штаммоспецифичную информацию, и подходят, скорее, для паспортизации штаммов. Спектры, получаемые методом saAFLP, не привязанного к какому-либо определенному участку генома, отражают инди-



**Рис. 4.** Результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР на препаратах ДНК *Bt* с применением праймеров к мобильным элементам ERIC (А) и BOX (Б). Дорожки 17, 19, 30 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК (1 kb ladder, «Fermentas»); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 p.o.; 6, 20 – *Bt* 787; 7 – *Bt* 411; 8 – *Bt* 072; 9, 24 – *Bt* 0371-1; 10, 28 – *Bt* 109; 11 – *Bt* 14; 12 – *Bt* 994; 13 – *Bt* 1b; 14 – *Bt* A/M; 15 – *Bt* 836; 16, 26 – *Bt* 0293; 18 – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы; 21 – *Bt* subsp. *israelensis* B-5246; 22 – *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223; 25 – *Bt* subsp. *subtoxicus* B-822; 27 – *Bt* subsp. *galleriae* B-197; 29 – *Bt* subsp. *finitimus* B-1162

видуальность каждого конкретного микроорганизма. Фингерпринты на основе этого метода выявляют различия между всеми проанализированными штаммами [34]. Специфичность спектров дает возможность делать предварительные заключения о характере родства, не прибегая к данным других праймеров или методов, за исключением определения родовой принадлежности микроорганизма, например, с помощью генов 16S рРНК или *gyrB*.

Однако для подтверждения достоверности подобных результатов и получения полной картины генетических взаимоотношений между близкородственными бактериями необходим анализ суммарных данных, полученных и методом saAFLP, и с помощью ERIC- и BOX-ПЦР.

В нашей работе при помощи трех методов – ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP – выявлены 36 полиморфных признаков (уникальных фрагментов) среди исследуемых штаммов и по полученным данным построена их дендрограмма (рис. 5). Генетические расстояния между парами штаммов определяли по алгоритмам

Пирсона (Pearson's correlation), простого различия (Simple difference) и расстояния Козине (Cosine) (данные не представлены). Полученные матрицы расстояний использовали при проведении кластерного анализа с помощью метода NJ. По результатам этого анализа все изучаемые нами штаммы были разделены на пять кластеров. Статистическая значимость порядка ветвления составила от 58 до 99%. Кластеры выделяли на основании сходства  $\geq 80\%$  и/или величины значимости ветвления  $\geq 50\%$ . Кластер 1 включал в себя штаммы *Bt* H10 R-типа, *Bt* A/N, *Bt* 408, *Bt* 409, *Bt* 410, *Bt* 5681st, *Bt* 787, *Bt* 411, *Bt* 072, *Bt* 0371-1, *Bt* 14, *Bt* 994, *Bt* 1a, *Bt* 1b, *Bt* A/M, *Bt* subsp. *israelensis* B-5246, *Bt* 0371-2 и типовой штамм *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223. Внутри данного кластера с высокой статистической значимостью порядка ветвления выделен штамм *Bt* 0376 p.o. Кластер 2 был образован двумя подвидами – *Bt* subsp. *galleriae* и *Bt* subsp. *subtoxicus*. Значимость ветвления  $< 50\%$  показывает, что, возможно, данные штаммы принадлежат разным подвидам и при увеличении выборки будут фор-

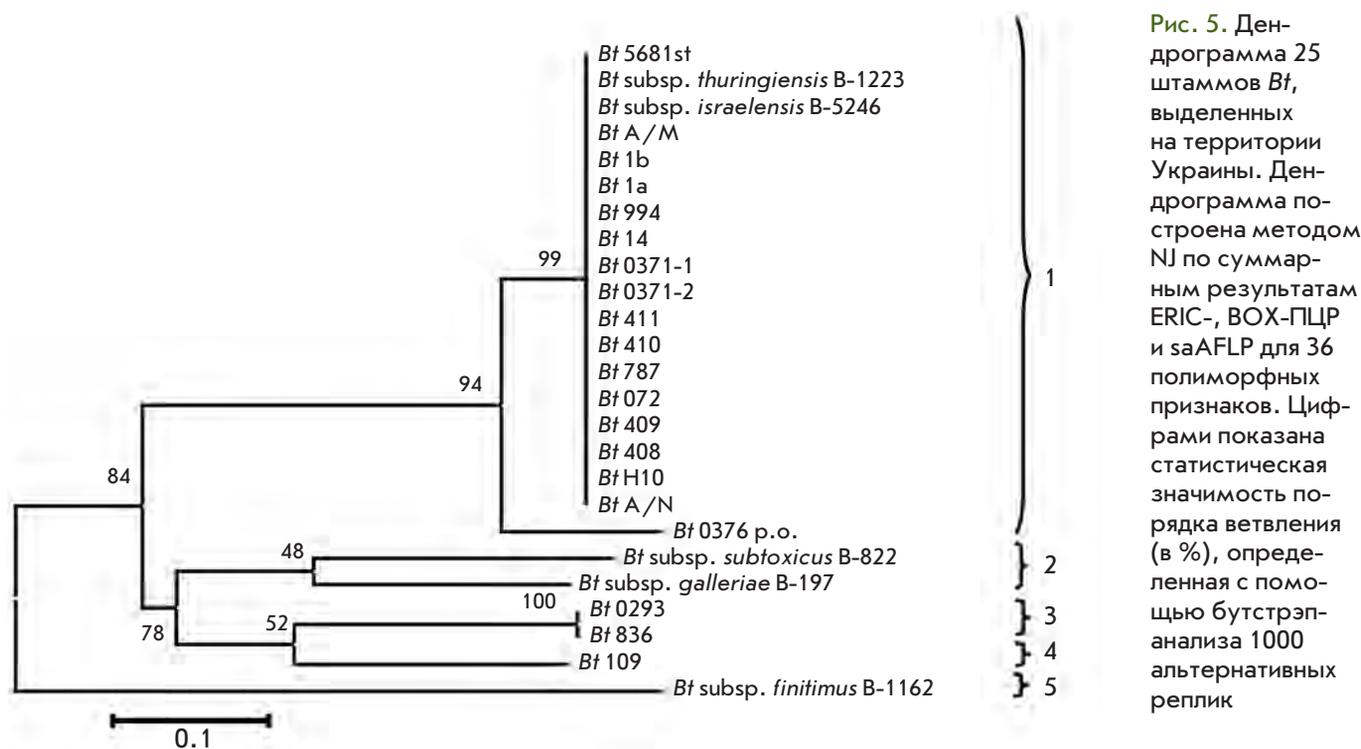


Рис. 5. Дендрограмма 25 штаммов *Bt*, выделенных на территории Украины. Дендрограмма построена методом NJ по суммарным результатам ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP для 36 полиморфных признаков. Цифрами показана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных реплик

мировать отдельные кластеры. Для подтверждения или опровержения данной гипотезы следует в дальнейшем расширить выборку штаммов. В кластер 3 вошли штаммы *Bt* 0293 и *Bt* 836, кластер 4 был представлен штаммом *Bt* 109, а кластер 5 – штаммом *Bt* subsp. *finitimus* B-1162.

На основании опубликованных и полученных нами данных можно сделать вывод о том, что для изучения и идентификации вида *Bt* группы *B. cereus* необходим комплексный подход, объединяющий анализ и биохимических свойств штамма, и молекулярно-биологические методы. Вид *Bt* можно успешно изучать с использованием нуклеотидной последовательности гена *gyrB*, на внутривидовом уровне – методом

saAFLP вместе с другими методами AP-ПЦР (реп-ПЦР). При помощи данных методов изученную нами выборку штаммов разделили на пять групп, что также соответствовало их уникальным биохимическим свойствам, определенным ранее в работах наших коллег [49]. Разработанный нами метод saAFLP позволил выявить фрагмент ДНК, уникальный для штамма *Bt* 0376 p.o., впервые выделенного нашими коллегами из ИСХК НААН и применяемого в производстве энтомопатогенного препарата «STAR-t». В дальнейшем планируется расширить выборку штаммов, изучить состав генов *cry*, определить нуклеотидные последовательности уникальных ДНК-фрагментов, выявленных в отдельных saAFLP-группах и штаммах. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hofte H., Whiteley H.R. // Microbiol. Rev. 1989. V. 53. P. 242–255.
- Feitelson J.S. // Advanced engineered pesticides / Ed. Kim L. N.Y.: Marcel Dekker, 1993. P. 63–72.
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Vanrie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. // Microbiol. Rev. 1998. V. 62. P. 807–813.
- Aronson A.I., Beckman W., Dunn P. // Microbiol. Rev. 1986. V. 50. P. 1–24.
- Rowe G.E., Margaritis A. // Crit. Rev. Biotechnol. 1987. V. 6. P. 87–127.
- Baumann L., Okamoto K., Unterman B.M., Lynch M.J., Baumann P. // J. Invertebr. Pathol. 1984. V. 44. P. 329–341.
- Aronson A.I. // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics / Eds Sonenshein A.B., Hoch J.A., Losick R. Washington, D.C.: Amer. Soc. Microbiol., 1993. P. 953–963.
- Ash C., Farrow J.A.E., Dorsch M., Stackebrandt E., Collins M.D. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. P. 343–346.
- Carlson C.R., Caugant D.A., Kolsto A.-B. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1719–1725.
- Wunschel D., Fox K.F., Black G.E., Fox A. // Syst. Appl. Microbiol. 1994. V. 17. P. 625–635.
- Bourque S.N., Valero J.R., Lavoie M.C., Levesque R.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1623–1626.
- Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.-B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2627–2630.
- Chen M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.

14. Thorne C.B. // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria / Ed. Soneshein A.L. Washington, D.C.: Amer. Soc. Microbiol., 1993. P. 113–124.
15. de Barjac H., Franchan E. // *Entomophaga*. 1990. V. 35. P. 233–240.
16. Lecadet M.-M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiery I. // *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 86. P. 660–672.
17. Hansen B.M., Damgaard P.H., Eilenberg J., Pedersen J.C. // *J. Invertebr. Pathol.* 1998. V. 71. P. 106–114.
18. Helgason E., Caugant D.A., Lecadet M.-M., Chen Y., Mahillon J., Hegna I., Kvaloy K., Kolsto A.-B. // *Curr. Microbiol.* 1998. V. 37. P. 80–87.
19. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.J. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 23. P. 7959–7970.
20. Somerville H.J., Jones M.L. // *J. Gen. Microbiol.* 1982. V. 73. P. 257–265.
21. Ko K.S., Kim J.M., Kim J.W., Jung B.Y., Kim W., Kim I.J., Kook Y.H. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 2908–2914.
22. Kiem P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S.E., Richmond K., Adair D.M., Hugh-Jones M., Kuske C.R., Jackson P. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 818–824.
23. Hill K., Ticknor L., Okinaka R., Asay M., Blair H., Bliss K., Laker M., Pardington P., Richardson A., Tonks M., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1068.
24. Ticknor L.O., Kolsto A.-B., Hill K.K., Keim P., Laker M.T., Tonks M., Jackson P.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 4863–4873.
25. Joung K.-B., Cote J.-C. // *J. Appl. Microbiol.* 2001. V. 90. P. 115–122.
26. Epplen J.T., Ammer H., Epplen C. / Oligonucleotide Fingerprinting Using Simple Repeat Motifs: A Convenient, Ubiquitously Applicable Method To Detect Hypervariability for Multiple Purposes // Eds Burke G., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. Basel: Birkhauser, 1991. P. 50–69.
27. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. P. 2286–2295.
28. Chaley M.B., Korotkov E.V., Skryabin K.G. // *DNA Res.* 1999. V. 6. P. 153–163.
29. Boulygina E.S., Ignatov A.N., Tsygankova S.V., Korotkov E.V., Kuznetsov B.B. // *Microbiology.* 2009. V. 78. № 6. P. 703–710.
30. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. // Eds Logan N.A., De Vos P. N.Y.: Springer, 2009. № 3. P. 21–128.
31. *Manual of Methods for General Bacteriology* // Eds Gerhardt P., Murray R.G., Costilow R.N., Nester E.W., Wood M.W., Krieg N.R., Phillips G.B. Washington, DC.: Am. Soc. Microbiol., 1981. P. 232–234.
32. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G. // *Nature*. 1977. V. 265. P. 687–695.
33. Lane D.J. / 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* // Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: Wiley, 1991. P. 115–175.
34. Yamamoto S., Harayama S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 1104–1109.
35. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F. // *Ekologicheskaya genetika*. 2012. V. 2. P. 49–62.
36. Zabeau M., Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting // European Patent Office. Munich. Germany. 1993. Publication 0534858A1.
37. Altschul S.F., Gish W., Miller W. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
38. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
39. Hall T.A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
40. Kumar S., Tamura K., Nei M. // *Briefings in Bioinformatics*. 2004. V. 5. P. 150–163.
41. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. P. 336.
42. Rzetsky A., Nei M. // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 945–967.
43. Priest F.G. / DNA homology in the genus *Bacillus*. In *The Aerobic Endospore-Forming Bacteria* // Eds Berkeley R.C.W., Goodfellow M. London: Acad. Press, 1981. P. 33–57.
44. Daffonchio D., Cherif A., Borin S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 5460–5468.
45. Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariyev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A. // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. № 8. P. 3711–3730.
46. Wang L.T., Lee F.L., Tai C.J., Kasai H. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 1846–1850.
47. La Duc M.T., Satomi M., Agata N., Venkateswaran K. // *J. Microbiol. Meth.* 2004. V. 56. P. 383–394.
48. Librado P., Rozas J. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
49. Parkhomenko A.L., Parkhomenko T.U., Lesovoy N.M. // *Scientific notes of Taurida V. Vernadsky National University. Series: Biology, Chemistry*. 2009. V. 22. № 3. P. 96–100.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать четырех.

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком \*.

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

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать 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  $\mu$ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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



ФЕСТИВАЛЬ ИДЕЙ И ЗНАНИЙ  
**ИСКУССТВО НАУКИ**  
**2013**



**ПЕРЕЗАГРУЗКА...**



# НТ-МДТ – приборостроение для нанотехнологий

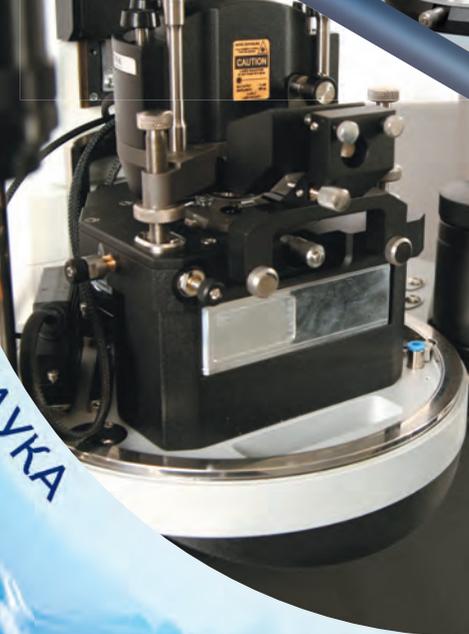
Комплексное оснащение нанотехнологических  
научно-производственных и научно-образовательных центров



ОБРАЗОВАНИЕ



НАУКА



ПРОИЗВОДСТВО



- НАНОЭДЬЮКАТОР – классы для практического обучения основам нанотехнологий.
- ИНТЕГРА – многофункциональные исследовательские зондовые нанолaborатории.
- НАНОФАБ - модульная платформа для исследования и мелкосерийного производства.

 **NT-MDT**  
*Molecular Devices and Tools for NanoTechnology*

\* Введите код на сайте [www.nt-mdt.ru](http://www.nt-mdt.ru) и получите подарок от компании НТ-МДТ. Внимание: количество подарков ограничено!

# NANOTECHNOLOGIES

## *in Russia*

Peer-review scientific journal

*Nanotechnologies in Russia*  
(*Rossiiskie Nanotekhnologii*)

focuses on self-organizing structures and nanoassemblages, nanostructures including nanotubes, functional nanomaterials, structural nanomaterials, devices and facilities on the basis of nanomaterials and nanotechnologies, metrology, standardization, and testing in nanotechnologies, nanophotonics, nanobiology.

→ **Russian edition:** <http://nanoru.ru>

→ **English edition:** <http://www.springer.com/materials/nanotechnology/journal/12201>

Issued with support from:



The Ministry of Education and Science of the Russian Federation