

# Письмо редакторов

**Д**орогие читатели!  
Предлагаем вашему вниманию 15-й, последний в этом году, номер *Acta Naturae*. Как всегда, номер открывается рубрикой «Форум», в которой представлены три публикации. Одна из них – «Сделано в России», связана с планируемой к принятию Государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности», в рамках которой предстоит существенно увеличить долю лекарственных средств и медицинских изделий отечественного производства в общем объеме потребления. Однако понятие «лекарственное средство отечественного производства» до сих пор не определено. Публикуемый материал представляет собой обмен мнениями представителей российской фарминдустрии по этой проблеме. Остальные две публикации – отклики членов-корреспондентов РАН В.И. Цетлина и А.Н. Томилина на присуждение Нобелевских премий 2012 года по химии – профессорам Р. Лефковицу и Б. Кобилке за исследования G-белоксопряженных рецепторов, и по физиологии и медицине – Дж. Гёрдону и Ш. Яманаке за открытие возможности репрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные. Открытия лауреатов в этих важнейших и необычайно интересных областях исследований заслу-

женно оценены мировым научным сообществом.

Научная составляющая номера традиционно состоит из обзоров и научных сообщений. Как нам кажется, обзоры посвящены актуальным вопросам и будут интересны многим нашим читателям. Шесть научных сообщений охватывают широкий спектр дисциплин. Здесь и биоорганическая химия (Е.С. Матюгина и др.), бионанотехнология (Ю.М. Евдокимов и др.), молекулярная (Е.Н. Люкманова и др., А.В. Головини др.) и клеточная (О.С. Петракова и др.) биология. Относительно новой тематикой для нашего журнала является работа А.М. Зиганшина и др., посвященная научным основам переработки отходов агропромышленного комплекса. Мы считаем, что такой широкий охват исследований, характерный для *Acta Naturae*, полезен, поскольку позволяет читателю узнать что-то новое из областей, которые обычно им не отслеживаются за неимением времени.

В заключение хочется подвести итоги уходящего 2012 года. За этот год наш журнал встал на ноги и добился первых успехов в международном признании – появился в PubMed! Давайте вместе стараться, чтобы авторитет *Acta Naturae* рос и впредь!

Поздравляем всех с наступающим Новым 2013 годом! ●

Редакционная коллегия

# Наука и технологии России – STRF.ru

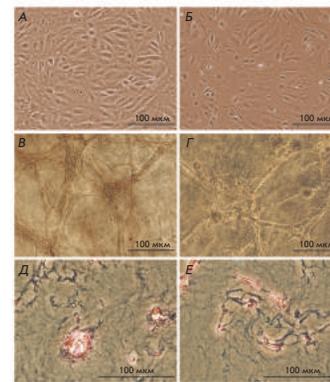


- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

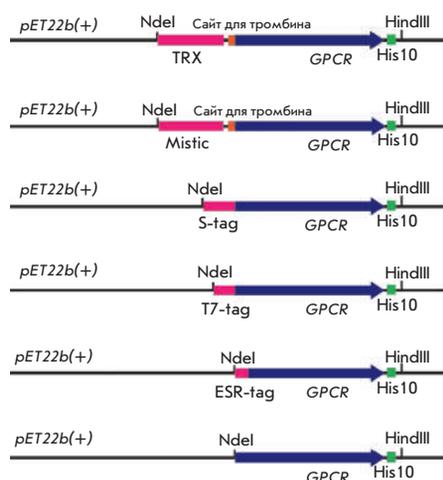
Откройте миру свои открытия

## Влияние 3D-условий культивирования на дифференцировку энтодермальных клеток

О. С. Петракова, В. В. Ашапкин, Е. А. Воротеляк, Е. Ю. Брагин, В. Ю. Штратникова, Е. С. Черниогло, Ю. В. Суханов, В. В. Терских, А. В. Васильев  
Клеточная терапия органов энтодермального происхождения представляет собой одну из важных задач современной клеточной биологии и биотехнологии. Наиболее перспективным направлением в этой области является изучение возможностей трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. Авторы показали, что прогениторные клетки печени при культивировании в 3D-условиях также приобретают способность к дифференцировке в панкреатическом направлении. Таким образом, постнатальные клетки слюнной железы проявляют значительную фенотипическую пластичность в пределах энтодермального зародышевого листка, они могут служить перспективным источником энтодермальных клеток для заместительной клеточной терапии заболеваний печени.



Морфология клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования



Дизайн экспрессирующих векторов, содержащих гены GPCR и дополнительные 5'-концевые последовательности

## N-Концевые партнеры для эффективной продукции рецепторов, сопряженных с G-белками, в бактериальных бесклеточных системах

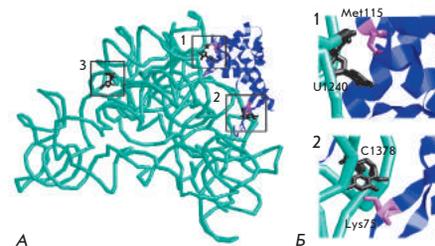
Е. Н. Люкманова, З. О. Шенкарев, Н. Ф. Хабибуллина, Д. С. Кульбацкий, М. А. Шулепко, Л. Е. Петровская, А. С. Арсеньев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

Семейство рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), – одно из наиболее многочисленных семейств мембранных белков человека. Эти рецепторы, несмотря на их огромную важность для новых разработок в области фармакологии и медицины, остаются малоизученными, прежде всего из-за отсутствия высокоэффективных систем гетерологической продукции. Предложена методология эффективной продукции GPCR в бактериальных бесклеточных системах. Авторы показали, что выход рецепторов может быть увеличен (в 5–38 раз) путем экспрессии слитых конструкций, содержащих дополнительные N-концевые аминокислотные последовательности.

## Идентификация нового РНК-белкового контакта в комплексе рибосомного белка S7 с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК E. coli

А. В. Головин, Г. А. Хайруллина, Б. Крааль, А. М. Копылов

Самосборка 30S малой субчастицы прокариотических рибосом *in vitro* из рРНК и 20 белков происходит иерархически и начинается взаимодействием 16S рРНК с тремя ключевыми белками: S4, S8 и S7. Эти же белки регулируют трансляцию своих оперонов, узнавая мРНК, поэтому изучение РНК-белковых взаимодействий в бинарных комплексах важно для понимания биогенеза рибосом. В представленной работе идентифицирован необычный рРНК-белковый контакт в бинарном комплексе рекомбинантного рибосомного белка S7 со своим участком связывания на фрагменте 16S рРНК *Escherichia coli* (236 нуклеотидов). По-видимому, структура бинарного рРНК-белкового комплекса, образующегося в начале сборки малой субчастицы, подвергается перегруппировке в процессе формирования целой субчастицы.



Корреляция данных PCA 30S субчастицы *E. coli* в кристалле и данных по сшивкам этой субчастицы в растворе

# Acta Naturae

ТОМ 4, № 4 (15), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2012

## 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

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

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 930 87 07.  
E-mail: actanaturae@gmail.com, 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, 2012

Номер подписан в печать 18 декабря 2012 г.  
Тираж 300 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Журнал *Acta Naturae* включен  
в базу данных PubMed.

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

## СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов ..... 1

### ФОРУМ

Долгий путь к трехмерной  
структуре и механизмам действия ..... 6

О Нобелевской премии  
по физиологии и медицине  
2012 года ..... 8

Сделано в России ..... 11

### ОБЗОРЫ

Е. С. Седова, Д. Н. Щербинин, А. И. Мигунов,  
Ю. А. Смирнов, Д. Ю. Логунов, М. М. Шмаров,  
Л. М. Цыбалова, Б. С. Народицкий,  
О. И. Киселев, А. Л. Гинцбург  
Гриппозные рекомбинантные  
вакцины. .... 17

С. П. Медведев, Е. А. Покушалов, С. М. Закиян  
Эпигенетика плюрипотентных  
клеток ..... 28

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О. С. Петракова, В. В. Ашапкин, Е. А. Воротеляк,  
Е. Ю. Брагин, В. Ю. Штратникова,  
Е. С. Черниогло, Ю. В. Суханов, В. В. Терских,  
А. В. Васильев

**Влияние 3D-условий культивирования  
на дифференцировку  
энтодермальных клеток . . . . . 48**

Е. Н. Люкманова, З. О. Шенкарев,  
Н. Ф. Хабибуллина, Д. С. Кульбацкий,  
М. А. Шулепко, Л. Е. Петровская,  
А. С. Арсеньев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

**N-Концевые партнеры для эффективной  
продукции рецепторов, сопряженных  
с G-белками, в бактериальных  
бесклеточных системах . . . . . 59**

А. В. Головин, Г. А. Хайруллина, Б. Крааль,  
А. М. Копылов

**Идентификация нового РНК-белкового  
контакта в комплексе рибосомного  
белка S7 с 3'-концевым  
фрагментом 16S рРНК *Escherichia coli* . . 67**

Е. С. Матюгина, С. Н. Андреевская,  
Т. Г. Смирнова, А. Л. Хандажинская

**Карбоциклические аналоги  
инозин-5'-монофосфата: синтез  
и биологическая активность . . . . . 75**

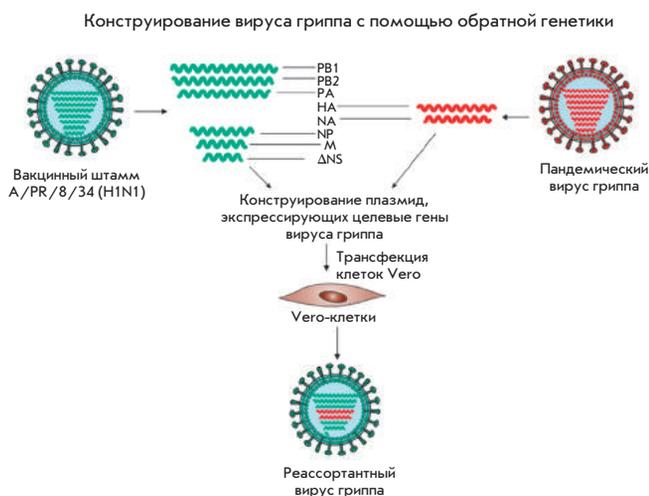
Ю. М. Евдокимов, В. И. Саянов, Е. И. Кац,  
С. Г. Скуридин

**Кластеры из наночастиц золота  
в квазинематических слоях частиц  
жидкокристаллических дисперсий  
двухцепочечных нуклеиновых кислот . . 80**

А. М. Зиганшин, Э. Э. Зиганшина,  
С. Кляйнштаубер, Ю. Протер, О. Н. Ильинская

**Динамика развития метаногенного  
сообщества в процессе анаэробной утили-  
зации отходов  
агропромышленного комплекса . . . . . 94**

**Правила для авторов . . . . . 101**



## РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Получение реассортантного штамма вируса гриппа с помощью обратной генетики (см. статью Седовой и др.)

## Долгий путь к трехмерной структуре и механизмам действия

Нобелевская премия по химии 2012 года присуждена профессору Медицинского центра Дюкского университета Роберту Лефковицу и профессору Медицинской школы Стэнфордского университета Брайану Кобилке «за исследования G-белоксопряженных рецепторов». Именно «за исследования», а не за открытие, установление или расшифровку чего-либо. Такая формулировка объясняется тем, что эти исследования продолжаются почти 40 лет, практически – от нулевого уровня до тех вершин, которые были покорены за последние несколько лет.

**Н**ачало 80-х годов прошлого века: как и для мембранных рецепторов других классов, еще только предстояло получить G-белоксопряженные рецепторы (GPCR) в виде индивидуальных белков, а затем и клонировать. Здесь следует отдать должное Р. Лефковицу, который для очистки и выделения адренергических рецепторов использовал синтез новых лигандов, аффинные модификации и другие методы. В 1987 году в лаборатории Р. Лефковица при активном участии его тогдашнего молодого сотрудника Б. Кобилки были получены клоны и проведена экспрессия  $\beta$ -адренергического рецептора человека. С тех пор Р. Лефковиц лидер в детальном изучении функционирования адренергических рецепторов и в выяснении общих принципов клеточной сигнализации с участием GPCR. Так, например, им открыта киназа  $\beta$ -адренергического рецептора, выяснены многообразные функции  $\beta$ -аррестина, детально охарактеризованы процессы фосфорилирования и десенситизации GPCR. Эти функциональные исследования Р. Лефковица всегда были тесно связаны с медициной, учитывая многообразие физиологических функций адренерги-

ческих рецепторов, в частности, регуляцию сердечной деятельности.

Деятельность Б. Кобилки за последние 20 лет была четко сфокусирована на установлении пространственной структуры GPCR. Не следует забывать, что все GPCR являются мембранными белками, кристаллизация которых, как и любых других мембранных белков, все еще считается чрезвычайно сложной задачей. Первые представления о пространственной структуре GPCR («семь столбов») дала электронная микроскопия бактериородопсина (Henderson, Unwin, 1975). Хотя этот белок представляет собой светоактивируемый протонный насос, а не GPCR, наличие связанного ретиналя и гомология первичных структур позволяли предположить наличие такой же структуры и в истинном GPCR – родопсине. В конце прошлого – начале этого века была получена электронно-микроскопическая структура бактериородопсина высокого разрешения (Henderson, 1998), а также установлена кристаллическая структура родопсина (Palczewski, 2000). Здесь уместно отметить, что первичные структуры бактериородопсина и родопсина были установлены в нашей стране школой акаде-

мика Ю.А. Овчинникова (1982), что потребовало разработки методов выделения и анализа мембранных белков. До установления кристаллической структуры родопсина в качестве модели для анализа пространственной организации GPCR использовали бактериородопсин, затем тем же целям служил родопсин, хотя вполне очевидны ограниченность такого подхода и необходимость знания детальной пространственной организации индивидуальных GPCR. Именно ради этой цели Б. Кобилка с сотрудниками настойчиво совершенствовали весь арсенал методов солюбилизации, стабилизации и кристаллизации мембранных белков, включая синтез новых детергентов, анализ комплексов GPCR с антителами или химеризацию с хорошо кристаллизующимися чужеродными белками, которые однако не нарушают функцию GPCR. Итог – в 2007 году они публикуют кристаллическую структуру  $\beta$ 2-адренергического рецептора с высоким разрешением. Затем появляются структуры комплексов этого рецептора с различными лигандами, что открывает возможности для конструирования новых лекарственных препаратов. При этом был накоплен громадный опыт и разработана



Chris Hildreth/Duke Photography/Duke University



Linda A. Cicero / Stanford News Service

Лауреаты Нобелевской премии по химии 2012 года Роберт Лефковиц и Брайан Кобилка

общая методология, поскольку за последние несколько лет Б. Кобилка и сотрудники установили кристаллические структуры двух индивидуальных подтипов мускариновых ацетилхолиновых рецепторов и  $\mu$ -опиатного рецептора, при этом практически одновременно пространственные структуры еще трех подтипов опиатных рецепторов были установлены в других американских лабораториях. Во всех случаях это не только структуры свободных GPCR-рецепторов, но и их комплексов с фармакологически важными лигандами, что открывает путь к выяснению фармакологических различий для рецепторов одного и того же семейства.

Б. Кобилка и сотрудники установили и структуру комплекса  $\beta 2$ -адренергического рецептора с G-белком. Таким образом, расшифрованные кристаллические структуры не только облегчают создание новых лекарственных препаратов, но и открывают путь к детальному выяснению молекулярных механизмов процессов клеточной сигнализации с участием этих рецепторов.

GPCR – самый распространенный класс мембранных рецепторов, и именно они являются мишенями более чем для 30% имеющихся на рынке лекарств. Но не следует думать, что другие классы мембранных рецепторов не заслуживают внимания или их

пространственные структуры представляют меньший интерес. Хочется напомнить, что в 2003 году Нобелевская премия по химии была присуждена Р. Агре и Р. МакКиннону, по сути, за установление пространственных структур аквапорина и потенциал-зависимого  $K^+$ -канала. В последние несколько лет установлены кристаллические структуры ряда лиганд-управляемых каналов, вовлеченных в формирование памяти, передачу болевых сигналов и участвующих в других важнейших физиологических процессах. ●

**В.И. Цетлин,**  
член-корреспондент РАН

## О Нобелевской премии по физиологии и медицине 2012 года

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2012 года присуждена Джону Бертрану Гёрдону и Шинии Яманаке «за открытие того, что зрелые клетки могут быть репрограммированы в плюрипотентные».

История длиной в 50 лет начала развиваться в 1962 году (в год рождения Яманаки), когда Джон Гёрдон путем пересадки ядер показал способность клеток кожи и кишечника лягушки давать начало новому организму, принципиально доказав, таким образом, что стволовые характеристики, утраченные в ходе развития амфибии, могут быть клеткам возвращены (Gurdon, 1962). Естественно, что ни о каких терапевтических приложениях открытия в то время речь не шла. Более чем 40 лет спустя Шиния Яманакэ опубликовал статью, в которой впервые показал, что соматические клетки млекопитающих также могут быть репрограммированы в плюрипотентное<sup>1</sup> состояние (Takahashi и Yamanaka, 2006). За эти 40 с лишним лет прошла череда менее громких, но также важных событий, без которых достижение Яманаки было бы невозможным. Так, Мартин Эванс в 1981 году впервые получил первые эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мыши (Evans и Kaufman, 1981), что не только открыло широкую возможность для изучения функций генов методами генного нокаута (Но-



Gladstone Institutes/Chris Goodfellow

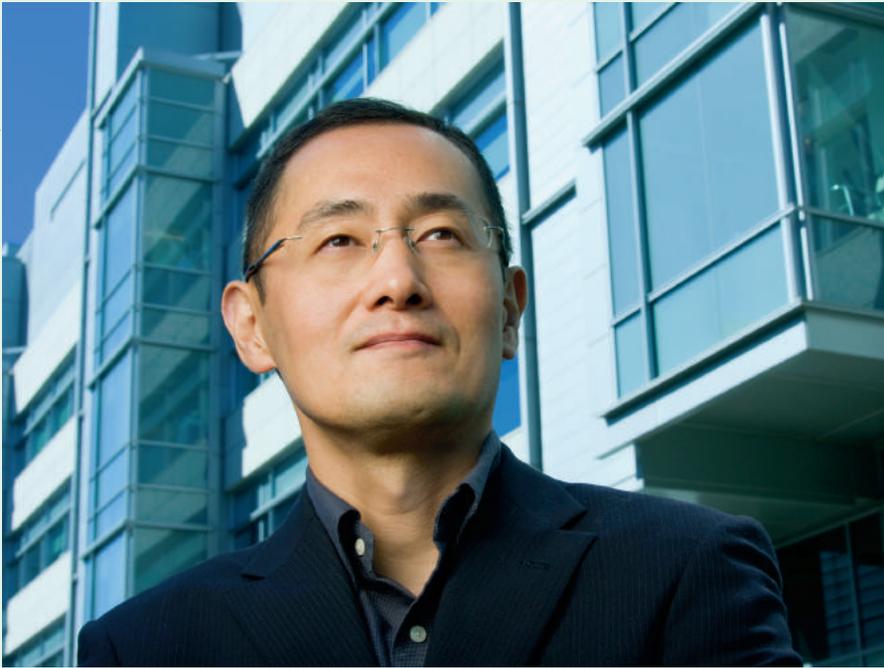
Джон Гёрдон

белевская премия за 2007 год), но и выдвинуло на передний план первый из известных типов плюрипотентных клеток, перспективных с точки зрения тканезамещения. Несмотря на значительные усилия, ЭС-клетки человека были получены значительно позже, только в 1999 году (Thomson et al., 1998), что обратило взоры многих исследователей к возможности тканезаместительной терапии у человека. Надо отметить и такое важное событие, как кло-

нирование Oct4 (Okamoto et al., 1990; Scholer et al., 1990) – одного из центральных генов, необходимого не только для поддержания клеточной плюрипотентности, но, как позже показал Яманакэ, и для ее возникновения.

Следующей после работ Гёрдона важной вехой в области клеточного репрограммирования явилось клонирование овцы, доказавшее принципиальную возможность превращения соматических ядер млекопитающих

<sup>1</sup> Плюрипотентностью обозначают способность клеток к самоподдержанию и дифференцировке во все клеточные типы тканей взрослой мыши (за исключением двух внезародышевых клеточных типов – трофобластической оболочки и первичной энтодермы).



Шинья Яманака

в тотипотентное<sup>1</sup> состояние. Достигалось такое репрограммирование путем подсадки ядер в цитоплазму ооцитов (Campbell et al., 1996). Стоит отметить в этой связи и ряд работ, в которых репрограммирование достигалось путем спонтанного или индуцированного слияния соматических клеток с ЭС-клетками (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Стало очевидным, что специализация клеточных типов в ходе развития млекопитающих является обратимым процессом.

С другой стороны, на передний план вышли очевидные недостатки ЭС-клеток, связанные как с их получением, требующим умерщвления эмбрионов, так и с проблемой высокого риска иммунного отторжения дифференцированных производных от ЭС-клеток в теле

реципиентов<sup>2</sup>. Таким образом, в начале 2000-х годов возник вопрос о получении плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток, что устранило бы моменты как этического, так и практического плана, присущие ЭС-клеткам. Несколько исследовательских групп, поверивших в возможность репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние при помощи форсированной генной экспрессии, в том числе и моя (в то время работавшая в Институте им. Макса Планка во Фрайбурге), трудились на этой почве, придумывая хитроумные системы скрининга факторов репрограммирования и селекции на плюрипотентность. Точку в этой гонке положил Яманака, который путем простого перебора 24 факторов, экспрессирующихся в ЭС-клетках мыши, вывел минимальную комбинацию транскрипционных факторов, достаточных для индукции плюрипотент-

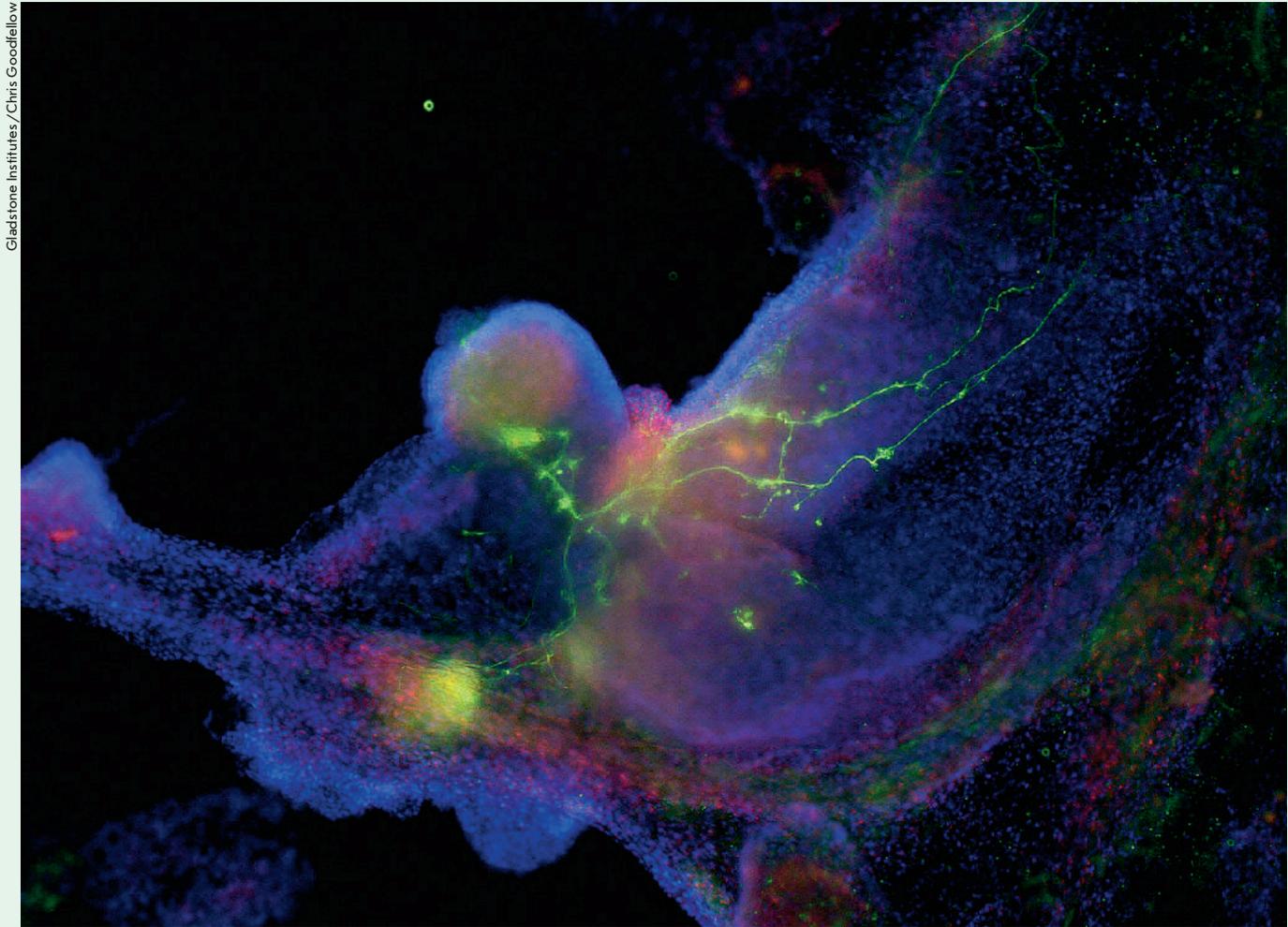
ности в фибробластах мыши: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, так называемого «коктейля Яманаки» (Takahashi и Yamanaka, 2006). Полученные в результате репрограммирования клетки, названные индуцированными плюрипотентными стволовыми (ИПС от англ. iPS) клетками, обладали практически неотличимыми от ЭС-клеток характеристиками.

С момента открытия индуцированной плюрипотентности прошло 6 лет, в свет вышло почти пять тысяч статей, описывающих альтернативные комбинации транскрипционных факторов, новые способы получения ИПС-клеток у разных видов (включая человека), предлагающих различные способы доставки (вирусный, плазмидный, транспозонный, белковый, РНК-овый), использующих различные исходные соматические клеточные типы, и т.д. За это время появился и ряд работ, выявивших недостатки ИПС-клеток, такие, как низкая эффективность их получения, неопределенность эпигенетического статуса, хромосомная нестабильность, повышенный по сравнению с ЭС-клетками уровень точечных мутаций и др. Указанные недостатки отодвигают перспективу использования ИПС-клеток в тканезамещении у человека. Однако уже сейчас ясно, что ИПС-клетки совершенно незаменимы как при создании *in vitro*-моделей широкого спектра заболеваний человека, так называемых «болезней в чашке Петри», так и при *in vitro*-скрининге лекарственных препаратов для лечения этих заболеваний.

Весьма ожидаемая и несомненно заслуженная Нобелевская премия 2012 года, таким образом, обозначила данный Гёрдоном старт и осуществленный Яманакой финиш 50-летней марафонской гонки за плюрипотентностью. Без всяких сомнений, результаты этой гонки сулят здоровью людей огромные выгоды. ●

<sup>1</sup> То есть способное дать начало всем зародышевым и везародышевым типам клеток; известны два тотипотентных типа клеток млекопитающих – зигота и ранние бластомеры.

<sup>2</sup> Создание банков охарактеризованных ЭС-клеток, охватывающих все возможные гистотипы, не осуществлено и по сей день.



Gladstone Institutes/Chris Goodfellow

Свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПС) сходны со свойствами эмбриональных стволовых (ЭС) клеток: на рисунке изображены ИПС-клетки, дифференцировавшиеся в нервные клетки (показаны зеленым цветом) и в клетки сердечной мышцы (показаны красным цветом)

Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // *Nature*. 1996. V. 380. P. 64–66.

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. P. 154–156.

Gurdon J.B. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells // *Developmental Biology*. 1962. V. 4. P. 256–273.

Matveeva N.M., Shilov A.G., Kaftanovskaya E.M., Maximovsky L.P., Zhelezova A.I., Golubitsa A.N., Bayborodin S.I., Fokina M.M., Serov O.L. *In vitro* and *in vivo* study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes // *Molecular Reproduction and Development*. 1998. V. 50. P. 128–138.

Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M., Hamada H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells // *Cell*. 1990. V. 60. P. 461–472.

Scholer H.R., Dressler G.R., Balling R., Rohdewohld H., Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex // *EMBO J*. 1990. V. 9. P. 2185–2195.

Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells // *Curr. Biol*. 2001. V. 11. P. 1553–1558.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.

Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // *Nature*. 2002. V. 416. P. 542–545.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. P. 1145–1147.

Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion // *Nature*. 2002. V. 416. P. 545–548.

**А.Н. Томилин,**  
член-корреспондент РАН



## Сделано в России

До конца 2012 года Правительство РФ должно утвердить Государственную программу «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы, включающую ныне действующую федеральную целевую программу «Фарма-2020». Одна из задач в проекте госпрограммы, подготовленном Министерством промышленности и торговли, – «увеличение к 2020 году доли лекарственных средств и медицинских изделий отечественного производства в общем объеме потребления здравоохранения Российской Федерации до 48%». При этом понятие лекарственного средства отечественного производства до сих пор законодательно не определено. В мае Минпромторг выпустил проект приказа, согласно которому отечественным лекарством следует считать то, цикл выпуска которого на территории России начинается с субстанции или готовой лекарственной формы. До 2014 года российскими лекарствами министерство готово было считать даже те, упаковка которых произведена в России. Дальнейших шагов, однако, не последовало. Поэтому вопрос о том, какие препараты и каких фармацевтических производителей считать отечественными, остается открытым. Своим мнением делятся представители российской фарминдустрии.

**Андрей Иващенко**, председатель Совета директоров ЦВТ «Хим-Рар»

– **Как вы считаете, насколько глубокая локализация фармпроизводства должна давать статус российского производителя?**

– У локализации производства есть два аспекта. Чего хочет российское государство? Покупая на миллиард долларов таблеток для народонаселения, оно хочет, чтобы как можно большая часть этой суммы была в рублях. Тогда у государства меньше бюджетных рисков. Допустим, на таблетки надо потратить 30 миллиардов рублей. Если при этом лекарства идут из-за рубежа, а курс изменится на 10%, то откуда-то придется взять еще 3 миллиарда. Положим, что в России продается какой-то препарат. Какая часть его стоимости была в долларах? Если он делается здесь с нуля,



**Андрей Иващенко:** За понятием препарата отечественного производства надо видеть государственные интересы, тогда будет понятно, куда движется ситуация

то вся его стоимость будет в рублях. Если субстанцию завезли из Китая, то 20–30% его стоимости будут в долларах. А если он просто куплен у дистрибьютора, тогда в долларах будут 90%.

Второй аспект – технологии, которые используются на территории нашей страны. Этот аспект важен с точки зрения лекарственной безопасности. Если на территории страны находятся только таблетирование и розлив по флаконам, это совсем простая технология. Если у нас синтезируются химические субстанции, то это уже лучше. В случае чего мы можем сами себе сделать таблетки. А если у нас еще, кроме синтетических субстанций, научились и биотехнологические делать, тогда все отлично, все технологии есть.

Соответственно возможны разные сочетания этих двух аспектов. Например, патент может быть иностранным, а производство будет в России – тогда боль-

шая часть стоимости лекарства будет в долларах, зато технология есть на территории нашей страны. Или, наоборот, патент может быть «наш», а производство – китайское. Тогда большая часть стоимости препарата складывается в рублях, но технологии у нас нет. Идеальный вариант, это когда и технология, и производство – все российское. Плохой вариант, который у нас сейчас более всего распространен, это просто покупка лекарств за рубежом. Соответственно вся государственная политика направлена на то, чтобы от худшего варианта перейти к лучшему.

Следующий момент госполитики – защита «своей» промышленности в условиях исчезновения государственных границ, например при вступлении в ВТО. Есть такой способ защиты, как технические регламенты. Положим, сейчас большая часть фармпроизводителей на территории страны умеет только выпускать готовую лекар-

ственную форму (ГЛФ). Поэтому государство решает, что отечественным производителем будет тот, кто выпускает ГЛФ на территории страны. Когда большинство из них научится делать субстанции, российским производителем можно будет считать того, кто делает субстанцию на территории страны. Думаю, что так ситуация и будет развиваться. Еще недавно можно было считаться российским производителем, всего лишь упаковывая готовые лекарства в картонные коробки. Теперь для этого уже надо уметь стерильно разливать, таблетировать и так далее. Я больше чем уверен: если политика будет идти так, как она идет, через пять лет, когда часть производителей начнут сами производить субстанции, они пролоббируют ситуацию, чтобы получить преференции.

За понятием препарата отечественного производства надо видеть государственные интересы, тогда будет понятно, куда движется ситуация. Это гибкая система. В ФЦП «Фарма-2020» указано, что к 2020 году половину фармацевтического рынка должны составлять препараты отечественного производства. Положим российские фирмы пооткрывают заводы в Китае, там производство дешевле. Рынок будет большей частью в рублях. Но случись война, где мы будем делать вакцины и таблетки? Надо локализовать какие-то технологии. Что государство и делает. Есть перечень стратегических лекарств, в нем перечислены 57 препаратов, которые должны полностью производиться на территории России. Если посмотреть на этот список, то видно, что производство этих препаратов требует владения всеми основными видами фармацевтических технологий.

По-моему, у Минпромторга вполне разумная позиция. Другое дело, что она находится в проти-

воречии с позицией Минздравсоцразвития и врачей. Врачам все равно откуда таблетки. Более того, они думают – и зачастую правильно, – что импортные таблетки качественнее. Здесь нужен компромисс, который рынком не регулируется. Должна быть межведомственная система регулирования, вместо которой сейчас Минпром давит на газ, локализуя производства, финансируя разработки, а Минздраву, в общем, все равно. Он жмет на тормоз, а двигатель-то портится.

Пока что межведомственных механизмов балансирования интересов нет. Но фирм, которые вкладываются в импортозамещающее производство все больше, поэтому на повестке дня вопрос уже стоит, он должен быть как-то решен. Возникнет механизм, а будет это межведомственная комиссия, или саморегулирующаяся организация, или еще что-то – неизвестно.

Локализация производства – об этом же. Государство побуждает зарубежные компании локализовать производство, но гарантий закупки не дает. Иностранцы вначале ходили и присматривались, потом один за другим начали строить, но ведь понятно, что если конкуренты уже проинвестировали в стройку, они теперь будут просить у государства преференций. И отечественные производители тоже. Поэтому отставать нельзя. Сейчас этот вал пошел. Первыми начали строить те, кому есть, что терять – это всякие восточноевропейские игроки, потому что с европейского рынка их вытесняют. Они производят брендовые дженерики, и Россия – последний заповедник, где их можно продавать. Поэтому первыми локализовали производство такие компании, как Polpharma, Stada, Gedeon Richter. Следующими идут европейские инновационные фирмы – Novartis,

Sanofi-Aventis. За ними через океан подтягиваются американцы с запозданием на год-два. В самом хвосте идут японцы.

Если посмотреть на конкурсы Минпромторга, там есть два типа мероприятий. Мероприятие под № 1 – это все, что касается импортозамещения. По всем конкурсам первого мероприятия идет сильная конкуренция. На каждый лот выходит по несколько игроков, которые сбрасывают цены. Это значит, что у нас в стране уже много кто реально занимается импортозамещающим производством. А значит, через 3–4 года все эти люди будут иметь зарегистрированные препараты и также будут конкурировать на госзакупках. Причем произведено это все будет на территории России.

**– Как это повлияет на востребованность разработок наших ученых?**

– Если наши разработки остаются, то, конечно, они никому не нужны. А если они впереди идут, то нужны. Мы же все равно глобально конкурируем – никуда от этого не денешься. Наше государство научится так же, как Америка или Европа, строить регуляторные виртуальные барьеры для защиты тех отраслей промышленности, которые важны для государства. Но жесткой стены не будет. Никто нас не защитит от конкуренции с иностранными производителями – поэтому здесь надо искать модели кооперации, встраиваться с иностранными производителями в цепочку добавленной стоимости на высокодоходное место. Например, в разработку. Конечно, местным разработчикам надо облегчать жизнь, но и закрываться наглухо от мирового рынка нельзя. Нужен баланс. Мы к нему идем, хотя разбалансированность госполитики и мешает. Но это, видимо, определенный этап, через который надо пройти.

**Александр Быков**, директор Департамента по работе с государственными и общественными структурами Novo Nordisk

**– Есть точка зрения, согласно которой отечественными нужно считать таких фармпроизводителей, которые имеют на территории России производство полного цикла: от субстанции до готовой формы. Как вы считаете, это правильный подход?**

– Я считаю, что настаивать на производстве субстанции не совсем корректно. Развивать фарминдустрию нужно, ориентируясь не на лекарственную безопасность, а на наукоемкость фармацевтического производства, на модернизацию индустрии, развитие интеллектуального потенциала. Тезис о безопасности применим только для узкой группы препаратов.

С другой стороны, положим, мы начнем производить субстанции. Это сложное химическое производство, в процессе которого мы столкнемся с нехваткой каких-нибудь дополнительных ингредиентов, катализаторов или приборов. Следуя заданной логике, нам нужно будет перенести в Россию и выпуск этих ингредиентов, катализаторов, сопутствующей техники, обеспечивающих функционирование нашего химического производства. А это путь к «чучхе» – северокорейской идеологии, в которой считается, что нужно опираться только на внутренние ресурсы.

**– Как, по вашему мнению, должна строиться политика государства в этой области?**

– Думаю, что надо создавать на рынке инвестиционную привлекательность, в первую очередь, давать преференции тем компаниям, которые локализуют свое производство здесь, в России, и модернизируют российскую экономику. Это могут быть и российские предприятия, которые



**Александр Быков:** Развивать фарминдустрию нужно, ориентируясь не на лекарственную безопасность, а на наукоемкость фармацевтического производства, на модернизацию индустрии, развитие интеллектуального потенциала

реорганизуют свой технологический процесс в соответствии со стандартами GMP или участвуют в совместных передовых разработках.

При этом в развитии фармацевтики сейчас нужно делать упор на биотехнологию, на новые направления в лекарственном синтезе. И если мы не будем частью глобальной индустрии, то можем оказаться на обочине. У нас, конечно, будут препараты. Процесс этот относительно прост: производить в России массовые лекарственные препараты на основе химического синтеза. Но если при небольшом объеме внутреннего потребления иностранных производителей будут принуждать к выпуску здесь биопрепаратов, то затраты на организацию такого производства просто не покроют возможную прибыль, и инвестиционная привлекательность будет снижаться. И пойдут эти инвестиции в Индию и в Китай.

**– То есть лучше всего считать российским производителем того,**

**кто производит здесь готовую лекарственную форму?**

– Да. К 2018 году объем отечественных препаратов по номенклатуре перечня стратегически значимых лекарственных средств и перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на рынке планируется довести до 90%. Но вступление в ВТО предполагает снятие избыточных торговых барьеров: так что, может быть, как раз к этому времени необходимость определения национального статуса производителей или продуктов отпадет вообще. Условия для продукции, произведенной в России или поступившей по импорту, должны быть идентичны, логично тогда и принципы ценообразования на лекарства, выпущенные в России, сделать эквивалентными общемировым. Госзакупки в рамках ВТО, конечно, не регулируются. Но вполне возможно, что через 5 лет Россия подпишет дополнительные соглашения, которые станут опре-

делять и эту часть рынка. Тогда предпочтения будут отменены.

**– Какова может быть реакция иностранных производителей на требование производить субстанцию в России, чтобы препарат считался отечественным?**

– Никакой реакции не будет. Те, кто уже локализовал производство, закрывать предприятия не станут. К дальнейшей локализации производства субстанций такая мера побудит только те компании, чьи препараты потребляются в больших, огромных объемах. В этом случае можно рассматривать вопрос о производстве субстанций в России. А если лекарство нужно всего лишь несколькими десяткам тысяч человек, то строить завод, который будет загружен только один-два дня, нет никакого резона. Если производить субстанцию в небольшом объеме, ее производство будет экономически затратным. Индия и Китай производят субстанции для всего земного шара: и для внутреннего рынка, и для внешнего, и для США, и для Европы. Крупные мультинациональные корпорации затем очищают индийские и китайские субстанции и производят готовую лекарственную форму. Поэтому возможно ли конкурировать в производстве субстанций с Индией? И нужно ли? Ведь выпуск субстанций – это не высокоинтеллектуальный процесс, а химическое производство, которое к тому же часто сопряжено с определенными экологическими издержками.

**– Как тогда следует стимулировать разработку новых препаратов в России?**

– Я думаю, что нужно развивать фармацевтические кластеры – они как раз и связывают научно-исследовательский комплекс с производственным. Научно-исследовательские организации – институты, центры, лаборатории – структурно не при-



Виктор Дмитриев: Сегодняшний ФЗ-94, где главное – цена, играет и против пациентов, и против отечественного производителя

надлежат фармацевтическим компаниям, работающим в фармкластере. В то же время они могут решать актуальные задачи отрасли, получать дополнительное финансирование по схеме государственно-частного партнерства. Но для того чтобы довести их разработки до рынка, нужна кооперация с индустрией, международной фармой. Случаи, когда препарат получает признание только на локальном рынке и при этом успешно продается, единичны.

**Виктор Дмитриев**, генеральный директор Ассоциации российских фармацевтических производителей

– **Ваша организация недавно выступала с предложением навести ясность в вопросе определения лекарственного препарата российского производства. Почему это важно?**

– Российский продукт участвует в государственных тендерах, поэтому важно, чтобы локальному товару были даны определен-

ные предпочтения, ведь госзакупки составляют 30% фармрынка. Они действительно предоставляются уже в течение трех лет согласно приказу Минэкономразвития о 15%-ных предпочтениях при бюджетных закупках в рамках ФЗ-94. Но в реальности эти предпочтения плохо работают, потому что техническая документация на торги составляется таким образом, что отечественные производители не могут воспользоваться своим преимуществом.

– **Что нужно сделать, чтобы эти предпочтения действительно работали?**

– Во-первых, должна быть политическая воля. Во-вторых, сегодняшний ФЗ-94, где главное – цена, играет и против пациентов, и против отечественного производителя. Мы бы предложили для регулирования закупок лекарств или отдельный параграф в законе, или вообще отдельный закон. Потому что лекарства – это товар, который не попадает под общие критерии. Что я имею в виду? Закон о техническом

регулировании предполагает, что качество определяет покупатель. Понравилась ему колбаса, он ее купил, не понравилась – не купил. С лекарствами так поступать нельзя, потому что эффект или качество лекарства порой можно проверить только в лаборатории. Как пример я могу привести статины, которые применяются для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Почувствовать их эффект невозможно, его можно оценить только по результатам анализов. Второй момент: у лекарств есть особое свойство, которого нет у других товаров. Это так называемый эффект плацебо, когда человек ожидает улучшения и даже ощущает его, но не всегда это обуславливается действием лекарства – срабатывает само ожидание.

Поэтому нужен отдельный закон, в котором я считаю необходимо прописать такие положения. Во-первых, при участии в госторгах отечественных производителей – допустим, двух, как в Белоруссии, – запретить участие лекарств иностранных компаний. Во-вторых, потребовать от участников наличия GMP-сертификата. Потому что сегодня отрасль очень пестрая. Есть компании, которые работают по мировым стандартам, и у них себестоимость лекарств выше, чем у тех, кто не работает по GMP, но зато и качество гарантировано. Третье условие – это гарантия объема поставок и цены на продукцию.

**Владимир Шипков**, исполнительный директор Ассоциации международных фармацевтических производителей

– **Минпромторг в разное время предлагал разные критерии определения препарата отечественного производства. Как, по вашему мнению, должен быть решен этот вопрос?**



**Владимир Шипков:** Идея считать российскими только те препараты, которые произведены на территории Российской Федерации по полному циклу, – это нонсенс

– Действительно, у Минпромторга до сих пор нет окончательного решения этого вопроса. Я не знаю, радоваться этому или огорчаться. Последний проект министерства предусматривает дополнительную мотивацию в зависимости от степени локализации производства. С одной стороны, хотелось бы приветствовать такой подход, хотя он до сих пор не реализован в виде действующих нормативных документов. С другой стороны, все попытки определить локальный продукт или локального производителя в условиях вступления в ВТО – малопонятная затея. Поскольку фармпроизводство является одним из наиболее глобализованных, правильнее было бы ставить вопрос о поддержке тех производителей, которые выпускают свои продукты в соответствии с общепринятыми международными стандартами качества. Потенциальным потребителям должно быть без разницы, где произведе-

ден тот или иной лекарственный препарат: в России, на Украине, в Казахстане, во Франции, в США или еще где-то. Важно, чтобы он соответствовал самым высоким международным требованиям.

**– Какие преференции, по вашему мнению, следует предоставлять российским производителям?**

– Те преференции, которые даются сейчас, мне кажутся медвежьей услугой. Вводить 15%-ную преференцию для препаратов, которые произведены на территории Российской Федерации, а с этого года и на территории Белоруссии, неправильно, так как она применяется к любым препаратам, вне зависимости от того, произведены ли они по нормам GMP или в «полугаражных» условиях. Надо мотивировать производителей инвестировать в модернизацию, поощряя внедрение GMP. И соответственно давать преференции тем производителям, которые работают по этим стандартам. Только в наших условиях

эти преференции должны быть намного больше, порядка 30–35%. Тогда это будет реальный стимул. Хочешь получать преференции? Хочешь выходить на рынки третьих стран, а не закрываться «железным занавесом»? Переводи свое производство на GMP. А еще нужно вводить дифференцированный подход: чем глубже процесс локализации – тем больше преференции. Но при условии соответствия GMP. Потом, когда все перейдут на GMP, эта норма может быть и упразднена.

**– Как вы считаете, какие требования к степени локализации при этом должны быть?**

– Все формы локализации должны приветствоваться. Идея считать российскими только те препараты, которые произведены на территории Российской Федерации по полному циклу, – это нонсенс. Среди российских производителей не так много тех, кто работает по полному циклу, включающему синтез субстанции. Абсурдные требования о полном цикле никак не способствуют привлечению инвестиций. Нужны дифференцированные преференции по всем степеням локализации: допустим, вторичная упаковка – 5%, готовая лекарственная форма – 15%, полный цикл – еще больше. Если сегодня с точки зрения одного инвестора нужно инвестировать в упаковку и пользоваться минимальными преференциями – надо сказать «спасибо» и за это. Он поработает некоторое время в этих условиях, посмотрит, что другие пользуются большими преимуществами при более глубокой степени локализации, и тогда тоже пойдет на большую локализацию, увеличение инвестиций, создание рабочих мест, цивилизованных условий производства. ●

**Подготовила  
Екатерина Боровикова**

УДК 571.27;578.74

# Гриппозные рекомбинантные вакцины

Е. С. Седова<sup>1\*</sup>, Д. Н. Щербинин<sup>1</sup>, А. И. Мигунов<sup>2</sup>, Ю. А. Смирнов<sup>1,3</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>,  
М. М. Шмаров<sup>1</sup>, Л. М. Цыбалова<sup>2</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, О. И. Киселев<sup>2</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гриппа Минздравсоцразвития Российской Федерации,  
197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского

Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

\*E-mail: sedova-es@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.07.2012

**РЕФЕРАТ** Обзор посвящен проблеме конструирования и получения новых гриппозных вакцин при помощи рекомбинантных технологий. Новые подходы к созданию гриппозных вакцин включают возможности обратной генетики, получение вирусоподобных частиц в различных экспрессионных системах и рекомбинантные технологии, позволяющие конструировать генетические вакцины. Большой интерес представляют такие подходы, как генетическая иммунизация, позволяющие сохранить нативную структуру антигенов вируса гриппа. Среди векторов, используемых для создания генетических вакцин, особое место занимают аденовирусные. Они легко взаимодействуют и проникают в клетки слизистой оболочки дыхательного тракта, что позволяет проводить мукозальную иммунизацию, обеспечивая длительную персистенцию антигена в организме и активизацию врожденного иммунитета. Обсуждается возможность использования панели аденовирусных векторов, несущих гены гемагглютинаина различных вирусов гриппа А, для создания вакцины, обеспечивающей защиту от большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** грипп, иммунизация, рекомбинантные вакцины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; Ad – аденовирус; HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; NP – нуклеопротеин.

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп – самое массовое инфекционное заболевание. По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире гриппом заболевают 20–30% детей и от 5 до 10% взрослых, а от тяжелых осложнений, вызванных гриппозной инфекцией, умирают от 250 до 500 тыс. человек. Экономический ущерб от эпидемий гриппа составляет 1–6 млн долларов на 100 тыс. населения [1]. При пандемиях масштабы ущерба и смертность значительно возрастают. Например, от пандемии гриппа в 1918–1919 годах умерли, по разным данным, от 50 до 100 млн человек [2].

Важнейшей мерой защиты от гриппозной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика [3]. Современные гриппозные вакцины индуцируют, как правило, образование антител к поверхностным антигенам вируса гриппа – гемагглютинину (HA) и нейраминидазе (NA). К таким вакцинам относятся как живые, так и инактивированные (цельновирсионные, расщепленные, субъединичные) вакцины. Эффективность сезонных вакцин прямо зависит от степени соответствия антигенной структуры

штаммов вируса гриппа, входящих в состав вакцины, и штаммов, циркулирующих среди населения в текущий эпидемический сезон. Поверхностные белки вируса гриппа подвергаются постоянной антигенной вариации (антигенный дрейф), что требует ежегодного обновления штаммового состава вакцин [4].

Разработка высокоиммуногенных и безопасных вакцин, индуцирующих иммунный ответ широкого спектра действия, является на сегодняшний день одной из основных проблем эффективной профилактики гриппа. Пандемия 2009–2010 годов, вызванная вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, и существующая пандемическая угроза, вызванная «птичьими» вирусами гриппа А (H5N1), поддерживают интерес к созданию новых вакцин, способных индуцировать широкий защитный иммунитет [5].

## Применение методов обратной генетики для создания гриппозных вакцин

Существующие гриппозные вакцины можно разделить на два вида: аттенуированные (живые) и инактивированные, включая субъединичные. Все они

Конструирование вируса гриппа с помощью обратной генетики

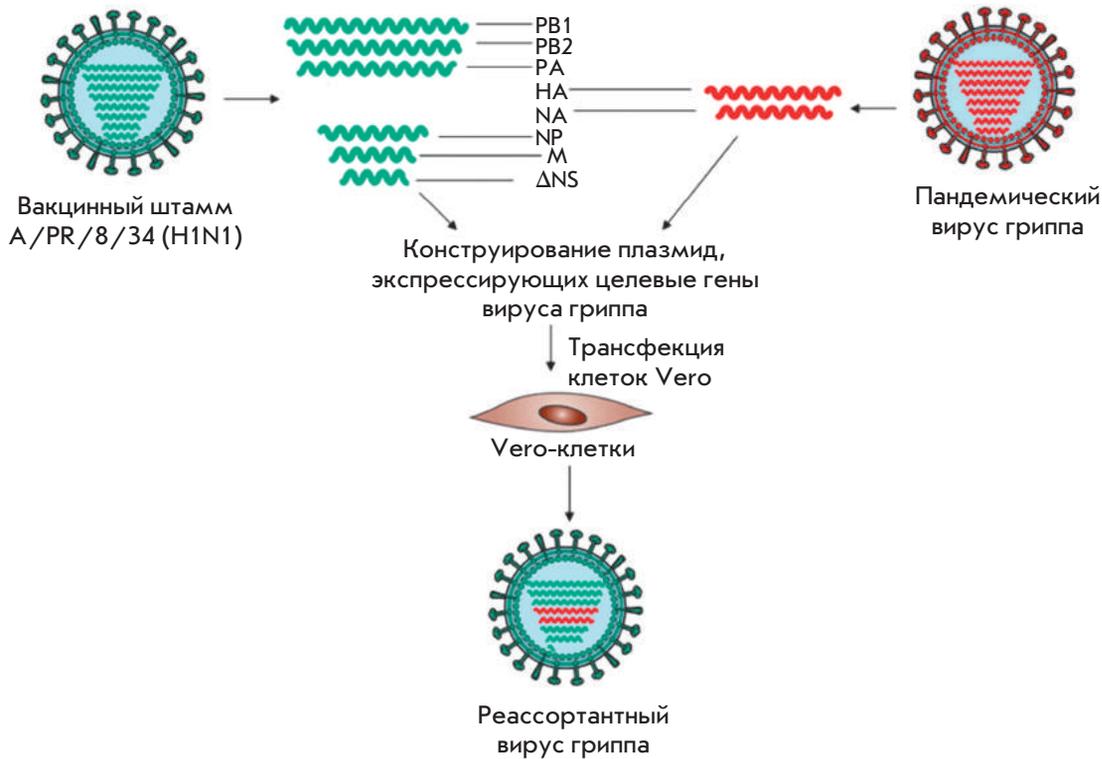


Рис. 1. Получение реассортантного штамма вируса гриппа с помощью обратной генетики

достаточно широко применяются при вакцинации населения и хорошо зарекомендовали себя. Атенуированные вакцины представляют собой вирусы гриппа с ослабленной вирулентностью [6]. При приготовлении инактивированных субъединичных вакцин также используются эпидемически актуальные штаммы вируса, хотя применение высокопатогенных штаммов ограничено высокими требованиями к биологической безопасности производства [7].

Традиционные способы получения вакцинных штаммов вируса гриппа А имеют ряд недостатков. Использование как аттенуации, основанной на адаптации вирусов к организму гетерологичного хозяина [8], так и реассортации при коинфекции эпидемическими штаммами и донорами аттенуации [9] не всегда позволяет сохранить баланс между уровнем вирулентности исходного вируса и его иммуногенностью. Чрезмерная аттенуация может привести к получению штаммов, утративших способность репродуцироваться в клетках дыхательных путей человека.

Альтернативным способом получения вакцинных штаммов является использование методов обратной генетики. Обратная генетика позволяет воссоздать биологически активную вирусную частицу путем коинфекции перmissive линий клеток плазмидами, содержащими гены, кодирующие вирусные белки. Внося изменения в эти гены, можно менять

вирулентность и антигенные свойства вируса гриппа [10].

С помощью методов обратной генетики можно получить реассортанты вирусов гриппа. Например, плазмидами, кодирующими сегменты генома пандемического или циркулирующего сезонного штамма и аттенуированного вакцинного штамма вируса гриппа А, трансфицируют перmissive эукариотические клетки. В результате происходит сборка полноценных вирионов вируса, несущих набор белков как вакцинного, так и патогенного штаммов (рис. 1). С помощью данного метода удалось получить и исследовать вирус гриппа А (H1N1), вызвавший в 1918 году пандемию («испанский грипп») [11].

Методы обратной генетики позволяют снижать вирулентность вируса путем введения мутаций в различные вирусные гены. Например, мутации в двух генах, кодирующих полимеразные белки PB1 и PB2 вируса гриппа птиц A/guinea fowl/Hong Kong/WF10199 (H9N2), привели к утрате патогенности вируса для кур [12]. Делеция неструктурного белка NS1 обеспечила аттенуацию вируса гриппа А. Полученная таким способом вакцина успешно прошла первую фазу клинических испытаний [13, 14]. Внесения мутаций в белок M2, необходимый для формирования ионного канала, также приводят к аттенуации вируса [15]. Изменение последовательности аминок-

кислот в сайте нарезания HA высокопатогенного вируса гриппа А H5 при помощи направленного мутагенеза привело к приобретению им характеристик низкопатогенных вирусов [16].

Методы обратной генетики хорошо зарекомендовали себя при получении аттенуированных штаммов вирусов гриппа [17]. Однако использование реассортации в случае вакцинных штаммов поднимает вопрос биобезопасности в связи с возможностью мутаций, восстанавливающих или повышающих вирулентность вируса [18]. Кроме того, широкое применение живых аттенуированных гриппозных вакцин вызывает опасение ввиду возможной реассортации живой вакцины с циркулирующими штаммами вирусов гриппа человека [19, 20]. В препаративных количествах вакцинные штаммы вируса гриппа чаще всего получают в куриных эмбрионах, что делает невозможным вакцинацию лиц с аллергией на куриный белок. Зависимость технологического процесса от продуктивности куриного стада также относится к недостаткам вакцин, получаемых с помощью куриных эмбрионов.

#### Рекомбинантные субъединичные вакцины

Решить проблемы, связанные с применением куриных эмбрионов и необходимостью аттенуации патогенных штаммов вируса гриппа, можно с использованием рекомбинантных субъединичных вакцин. Одним из новых подходов к получению субъединичных вакцин против вирусов гриппа является применение различных систем экспрессии для быстрой продукции отдельных вирусных белков в препаративных количествах [21].

В одной из популярных систем экспрессии гриппозные антигены продуцируют в клетках насекомых при помощи бакуловирусных векторов, несущих гены целевых антигенов. Наиболее широко используют вирус множественного ядерного полиэдроза калифорнийской совки (AcMNPV). Для работы с AcMNPV обычно используют линии клеток Sf9, полученные из яичника гусениц *Spodoptera frugiperda*. В этой системе можно продуцировать различные антигены вируса гриппа А. Иммунизация мышей рекомбинантным HA вируса гриппа H5N1, полученным в бакуловирусной системе экспрессии, приводила к индукции высокого уровня вируснейтрализующих антител. Однако для достижения значимых уровней антител требовалось либо применение адъюванта, либо прайм-буст-иммунизация с помощью инактивированного вируса гриппа H5N1 или рекомбинантного аденовируса, несущего ген HA вируса гриппа [22].

Одним из наиболее перспективных кандидатов для создания субъединичных вакцин против вируса гриппа считается белок M2, формирующий ионный

канал. M2 – один из трех белков вируса гриппа А, экспрессируемых на поверхности вириона, и, в отличие от HA и NA, высококонсервативный. В вирусах, циркулирующих в человеческой популяции, эктодомен белка M2 (M2e) практически не претерпел изменений с 1933 года [23], поэтому белок M2e рассматривается в качестве кандидата для создания вакцин широкого спектра действия. Так, показана возможность применения вируса мозаики огурца для экспрессии белка M2e вируса гриппа А H5N1 в растениях [24].

Недостатком рекомбинантных субъединичных вакцин, как и традиционных субъединичных вакцин, являются низкая иммуногенность и, как следствие, необходимость многократной вакцинации и применения адъювантов. Один из способов решения этой проблемы состоит во включении в состав субъединичных вакцин молекулярных адъювантов – лигандов различных рецепторов системы врожденного иммунитета. Рекомбинантный белок ST2.4×M2e, продуцируемый в клетках *Escherichia coli* и включающий флагеллин, лиганд для Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5), позволял защитить иммунизированных мышей от летальной дозы вируса гриппа [25]. Безопасность и эффективность вакцины на основе полученной конструкции показаны на взрослых добровольцах [26].

Внутримышечная иммунизация мышей полученным в *E. coli* рекомбинантным слитым белком 4×M2e·HSP70с, состоящим из последовательных повторов белков M2e и HSP70 *Mycobacterium tuberculosis*, приводила к значительному снижению падения веса, уменьшению титра вируса в легких и менее выраженному проявлению симптомов заболевания при заражении летальной дозой вирусов гриппа А H1N1, H3N2 или H9N2 [27].

#### Вирусоподобные частицы

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой антигенные детерминанты вирионов без фрагментов геномной РНК. Благодаря отсутствию генетического материала ВПЧ не способны инфицировать клетки человека и животных, что обеспечивает их безопасность [18]. Поверхностные белки гриппозных ВПЧ могут представлять конформационные эпитопы клеткам иммунной системы как нативные вирионы.

В ряде исследований показано, что в формировании гриппозных ВПЧ ключевую роль играет участие внутреннего белка вируса гриппа – M1. Этот белок связывается с липидным участком апикального домена плазматической мембраны, взаимодействует с поверхностными гликопротеинами вируса гриппа и инициирует сборку и почкование ВПЧ, содержащих липидную мембрану клетки-хозяина с инкорпо-

рированными в нее тремя трансмембранными белками вируса гриппа [28].

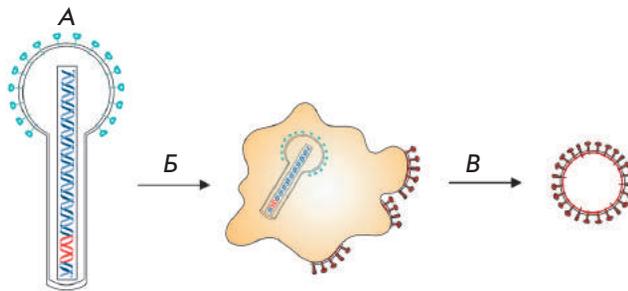
Гриппозные ВПЧ получены в различных системах экспрессии. Для эффективного освобождения из клеток млекопитающих гриппозных ВПЧ, содержащих НА, необходима либо одновременная экспрессия НА, либо добавление экзогенной НА. Это связано со способностью активной НА расщеплять сиаловые кислоты на поверхности клеточной мембраны [29]. В клетках насекомых гриппозные ВПЧ, содержащие НА, можно получить даже в отсутствие экспрессии НА, так как в этих клетках сиаловые кислоты не связываются с N-гликанами в процессе посттрансляционной модификации [30].

Один из подходов к получению гриппозных ВПЧ в клетках насекомых предполагает использование рекомбинантных бакуловирусов (рис. 2) [1]. На животных моделях показано, что поверхностные гриппозные антигены в составе ВПЧ, полученные при помощи рекомбинантных бакуловирусов, индуцировали выработку как антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител, так и эффекторов клеточного иммунного ответа. Кроме того, вакцина на основе гриппозных ВПЧ индуцировала протективный иммунитет против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса гриппа А [31].

Вакцина на основе ВПЧ, несущих антигены пандемического вируса гриппа А H1N1(2009), прошла вторую фазу клинических испытаний на 4 563 здоровых взрослых добровольцах и показала безопасность и иммуногенность [32].

Использование рекомбинантных бакуловирусов для экспрессии белков вируса гриппа в клетках насекомых приводит к накоплению в культуральной жидкости не только ВПЧ, но и бакуловирусов. Поскольку эти структуры близки между собой по размерам, возникают проблемы с очисткой ВПЧ от бакуловирусных частиц. Гриппозные ВПЧ могут быть получены в клетках млекопитающих с помощью других ДНК- и вирусных векторов. Например, разработана система продукции гриппозных ВПЧ в клетках Vero при помощи ДНК-векторов, несущих гены НА, NA, белков М1 и М2 вируса гриппа. Описано использование модифицированного вируса осповакцины Анкара для получения ВПЧ, содержащих белки вируса гриппа H5N1 (НА, NA, М1) в клетках млекопитающих. Такие ВПЧ способны формировать протективный иммунный ответ у мышей [33].

Таким образом, получение ВПЧ представляет перспективное направление при разработке гриппозных вакцин нового типа. Для усиления иммуногенности были предприняты попытки ввести в структуру гриппозных ВПЧ компоненты, стимулирующие иммунитет. С этой целью были получены рекомбинант-



**Рис. 2.** Получение вирусоподобных частиц при помощи бакуловирусной системы экспрессии. А – Конструирование рекомбинантного бакуловируса, несущего гены белка вируса гриппа, генно-инженерными методами; Б – трансдукция клеток насекомых данным вектором; В – отпочковывание от трансдуцированных клеток вирусоподобных частиц

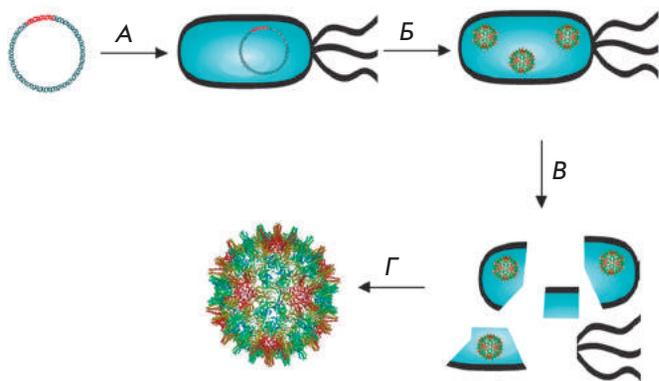
ные бакуловирусы, несущие ген флагеллина – лиганда TLR-5. Присутствие рекомбинантного флагеллина в составе гриппозных ВПЧ, содержащих НА вируса гриппа А/PR8 (H1N1), существенно усиливало иммуногенность и протективные свойства ВПЧ при заражении иммунизированных мышей гетерологичным штаммом вируса гриппа [34].

### Протеосомы

Методами генной инженерии можно получить наноразмерные структуры, в состав которых входит целевой антиген, соединенный с носителем, состоящим из макромолекул биологического происхождения. В результате самосборки таких макромолекул могут быть получены так называемые протеосомы, представляющие собой комплекс белков, диаметром около 30–60 нм, несущий на своей поверхности целевой антиген. Несмотря на то что многие авторы называют такие структуры вирусоподобными частицами, однако, в отличие от ВПЧ, основой для образования протеосом служит белок-носитель.

Наиболее часто в качестве основы для создания протеосом используют белки вирусной оболочки, например пентон аденовируса [35], белок L1 папилломавируса человека [36], НВс-антиген вируса гепатита В [37] (рис. 3).

Получены протеосомы, содержащие белок М1 вируса гриппа А, связанный через WW-домен со структурой, включающей поверхностные белки аденовируса (додекаэдрон). Комплекс додекаэдрона с антигеном способен активировать дендритные клетки человека, которые после активации представляют антиген цитотоксическим Т-лимфоцитам [38]. В качестве носителя белка М2е вируса гриппа



**Рис. 3.** Получение протеосом. А – Трансформация штамма-продуцента плазмидой с целевым трансгеном и белками протеосомы; Б – сборка протеосом в клетках и их экспрессия; В – выделение протеосом из культуры штамма-продуцента; Г – очистка и получение готовых протеосом

или различных эпитопов белка М2 использовали белок L1 папилломавируса человека [36], а также белок оболочки бактериофага Q $\beta$  [39], капсидный белок вируса мозаики папайи [40] и антиген вируса гепатита сурков [41].

Наибольший интерес в качестве белка-носителя вызывает НВс-антиген вируса гепатита В, мономер которого способен собираться в наноразмерные частицы. Такие химерные частицы были использованы в качестве белка-носителя белка М2е вируса гриппа. Гибридный белок М2е-НВс получали в клетках *E. coli*. Иммунизация мышей рекомбинантными М2е-НВс-протеосомами обеспечивала защиту от летальной гриппозной инфекции даже в присутствии предсуществующих антител к НВс-антигену [37]. Описана система получения М2е-НВс-протеосом в клетках растений *Nicotiana benthamiana* при помощи рекомбинантного вирусного вектора, основанного на X-вирусе картофеля [42].

Несомненным преимуществом протеосом является их способность нести множество антигенных детерминант на своей поверхности [36]. Однако антигены, представленные таким способом, не всегда обладают достаточной иммуногенностью. К недостаткам протеосом относится также их способность нести пептиды только небольшого размера.

### Генетические вакцины

Принцип создания любой генетической вакцины заключается в том, что определенный ген или участок генома патогена встраивается в вектор-носитель, который затем используется для вакцинации. Такие вакцины обеспечивают попадание генетического материала в клетки-хозяина и экспрессию в них ге-

нов белков патогена. В результате экспрессируемые клетками организма антигены патогена распознаются иммунной системой, что приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Структура целевых антигенов максимально близка к структуре, формируемой при вирусной инфекции. При получении генетических вакцин отпадает необходимость в выделении и очистке антигенов, а значит – в работе непосредственно с патогенами. Кроме того, применение различных векторов на основе рекомбинантных вирусов, благодаря присутствию в них молекулярных патоген-ассоциированных структур, индуцирующих врожденный иммунитет, может оказывать дополнительное иммуностимулирующее действие [43].

Из разнообразия генетических вакцин можно выделить три основные группы: ДНК-вакцины, векторные бактериальные вакцины и векторные вирусные вакцины.

### ДНК-вакцины

ДНК-вакцины – это бактериальные плазмиды, в которые включен целевой ген и регуляторные элементы, обеспечивающие его экспрессию после введения такой конструкции в организм [44].

Уровень клеточного и гуморального ответа, индуцированного введением ДНК-вакцины, часто бывает недостаточным для формирования иммунитета против патогена. Поэтому при использовании ДНК-вакцин, как правило, требуется применение адъювантов для повышения иммуногенности, а также таких процедур, как электропорация и *gen-gun* (или введение с помощью «генной пушки», аппарата, выстреливающего микроскопическими частицами, покрытыми ДНК), для лучшего проникновения генетического материала в клетки [10].

Первая фаза клинических испытаний ДНК-вакцины, экспрессирующей НА вируса гриппа птиц А/Vietnam/1203/04 (H5N1) с применением адъюванта, выявила образование гемагглютинирующий антител у 47–67% и индукцию Т-клеточного ответа у 75–100% иммунизированных добровольцев. Трехвалентная вакцина, содержащая плазмиды, экспрессирующие NP, М2 и НА этого же вируса гриппа, индуцировала Т-клеточный ответ у 72% иммунизированных [45]. Достаточно перспективным может быть и использование ДНК-вакцин для праймирования иммунной системы в комбинации с вакцинами различного типа (ВПЧ [46], аттенуированная вакцина [47], рекомбинантный аденовирус [48]).

### Вакцины на основе рекомбинантных бактериальных векторов

В качестве бактериальных векторов для создания

генетических вакцин используются аттенуированные штаммы таких бактерий, как BCG, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* и др. Особенностью бактериальных векторов является их способность доставлять антиген в антигенпредставляющие клетки, а также возможность создания на их основе вакцин для введения через слизистые оболочки. При использовании бактериальных векторов происходит активация врожденного иммунитета в результате взаимодействия бактериальных компонентов с рецепторами системы врожденного иммунитета [49].

Иммунизация мышей бактериальными векторами на основе *L. monocytogenes*, несущими ген NP вируса гриппа А, снижала титр вируса гриппа в легких зараженных мышей [50]. Безопасность и иммуногенность такой вакцины показаны на добровольцах [51]. Применение вакцинного вектора BPZE1 на основе *Bordetella pertussis*, несущего ген белка M2e вируса гриппа А, индуцировало у мышей образование антител к M2e и уменьшало титры вируса гриппа в легких после заражения А/PR8 (H1N1). Однако такая вакцина не могла полностью защитить животных при заражении летальной дозой вируса [52].

При использовании бактериальных векторов формируемый иммунный ответ не всегда достаточен для защиты, поэтому необходимо применять дополнительные средства повышения иммуногенности вакцин. Серьезной проблемой в случае бактериальных векторов может быть вероятность передачи плазмиды, несущей трансген, другим бактериям. Кроме того, существует возможность инсерционного мутагенеза [53].

### **Вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов**

Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроены целевые гены с набором регуляторных элементов. Среди существующих систем доставки антигенов вирусные векторы занимают особое место, поскольку обладают следующими свойствами: имеют природный механизм взаимодействия с клеткой и проникновения в нее; переносят чужеродный генетический материал в ядро клетки; способны обеспечивать длительную экспрессию антигена; вирусная оболочка защищает генетический материал, кодирующий антиген [54].

Вакцины на основе вирусных векторов эффективно активируют цитотоксические Т-лимфоциты, что особенно важно при вакцинации против внутриклеточных патогенов. Такие вакцины могут реализовать широкий спектр действия за счет индукции Т-клеточного ответа на консервативные эпитопы, потенциально способные обеспечить защиту от различ-

ных штаммов патогенов (в том числе вируса гриппа) [55].

Вирусные векторы обладают способностью активировать врожденный иммунитет путем связывания генетического материала или белков их оболочки с паттерн-распознающими рецепторами (TLR, RIG-1 и др.) [56]. Вирусные векторы распознаются такими TLR, как TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9. При взаимодействии этих рецепторов с лигандами активируются различные факторы транскрипции, что приводит к формированию очага воспаления и быстрой активации защитных реакций организма [57].

При выборе вирусного вектора для генетической иммунизации необходимо руководствоваться следующими критериями: такая вакцина не должна вызывать симптомов заболевания, она должна быть безопасной для людей с ослабленным иммунитетом, пожилых и детей; собственные белки рекомбинантного вируса не должны вызывать сильного иммунного ответа; вирусный вектор должен быть простым для генетических манипуляций и позволять включать большие фрагменты чужеродной ДНК; полученные препараты должны иметь высокий титр и обеспечивать высокий уровень экспрессии целевых антигенов; при иммунизации ДНК вирусного вектора не должна интегрироваться в геном клетки-хозяина, и сам вектор должен полностью выводиться из организма после индукции иммунного ответа. Кроме того, нежелательно наличие предсуществующего иммунного ответа к белкам вирусного вектора у иммунизируемых индивидов, так как он может существенно снизить уровень иммунного ответа на целевой антиген [58].

Не все вирусы обладают свойствами, необходимыми для создания эффективных векторов. Для создания гриппозных вакцин на основе вирусных векторов в настоящее время наиболее широко используются поксвирусы [59], вирус болезни Ньюкасла [60] и аденовирусы [61].

**Рекомбинантные поксвирусы.** Поксвирусы (Poxviridae) – это ДНК-содержащие вирусы с большим геномом. Среди поксвирусов, используемых в качестве вирусного вектора, наиболее популярен вирус осповакцины, к преимуществам которого относятся простота и дешевизна получения, а также высокая пакующая емкость (до 25 т.п.н.) [59]. Для получения вакцин используют аттенуированные вирусы осповакцины, такие, как модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) и аттенуированный штамм NYVAC, полученный на основе штамма Копенгаген. Аттенуирование MVA было достигнуто путем многократного пассирования в фибробластах куриных

эмбрионов, что привело к потере ряда генов, не существенных для репликации в клетках птиц, и снижению репродукции в клетках человека. Атенуация штамма NYVAC была достигнута путем делеции 18 генов, в результате чего вирус стал репликативно-дефектным для клеток человека [62].

Показано, что иммунизация мышей MVA, экспрессирующим гены HA высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1, обеспечила защиту мышей как от гомологичного, так и от гетерологичных штаммов вируса гриппа H5N1, а также индукцию вируснейтрализующих антител и HA-специфичных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток [63]. Вакцина на основе MVA, экспрессирующая ген HA вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1), была эффективной при двукратной иммунизации мышей, макак и хорьков [64]. Эффективность вакцины на основе штамма NYVAC, экспрессирующего ген HA вируса гриппа A птиц H5N1, показана на свиньях [65].

Серьезный недостаток векторов на основе вируса осповакцины – предсуществующий иммунитет к этому вирусу, который сформировался в человеческой популяции в результате иммунизации против оспы. Поэтому целесообразно использовать векторы на основе таких поксвирусов, как вирус оспы канарейки (Canarypox) и вирус оспы домашней птицы (Flowpox), к которым в человеческой популяции отсутствуют предсуществующие антитела. Иммунизация кур и уток рекомбинантным Flowpox-вирусом, в геном которого введен ген HA вируса гриппа A птиц, защищала птиц от заражения летальными дозами гомологичных вирусов гриппа [66]. Высокая пакующая емкость поксвирусов позволяет вводить в геном сразу несколько трансгенов, например гены HA и NP вируса гриппа A [66]. Однако Canarypox и Flowpox индуцируют более слабый иммунный ответ на целевые антигены, чем вирус осповакцины, и требуют многократного введения или использования адъювантов [66].

**Рекомбинантный вирус болезни Ньюкасла.** Вирус болезни Ньюкасла (NDV) относится к семейству Paramyxoviridae. Это вирус с несегментированным одноцепочечным РНК-геном, который содержит шесть генов, кодирующих семь белков: NP, Р- и V-белки, М-белок, белок слияния, или F-белок, HA-NA и большой полимеразный белок L. Так как уровень экспрессии каждого вирусного белка снижается в направлении от 3'- до 5'-конца генома, при использовании NDV в качестве вектора уровень экспрессии чужеродного гена можно контролировать по его положению в вирусном геноме. Уровень вирулентности и тропизм NDV зависят от сайта нарезания протеазами F-белка, необходимого для сли-

яния вирусной оболочки и клеточной мембраны. Таким образом, вирулентность вируса можно изменить при помощи аминокислотных замен в F-белке, что позволяет считать этот вирус удобной основой для создания вакцинных векторов [60].

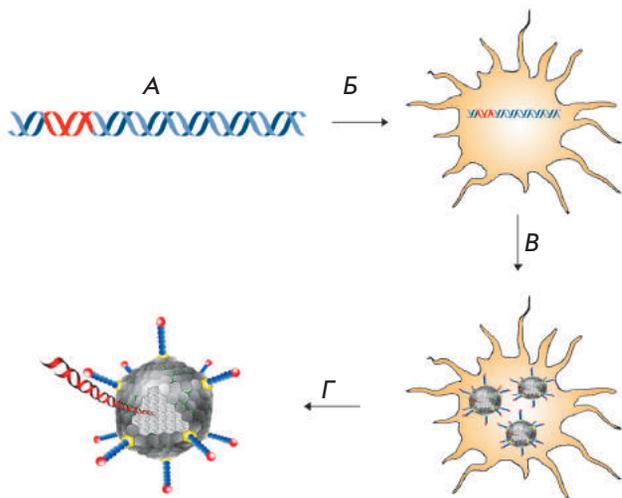
NDV, экспрессирующий ген HA вируса гриппа A/WSN/3 (H1N1), получен методом обратной генетики. При помощи этой конструкции мышей удалось защитить от заражения вирусом гриппа A/WSN/3 (H1N1) [60]. NDV, экспрессирующий гены HA высокопатогенных вирусов гриппа A птиц H5 и H7, защищал иммунизированных птиц от заражения летальными дозами гомологичных вирусов гриппа A. Эффективность иммунизации рекомбинантным NDV, экспрессирующим ген HA высокопатогенного вируса гриппа птиц A H5, показана на мышах [67].

NDV в природе инфицирует только птиц, поэтому антитела к этому вирусу у человека отсутствуют. Следовательно, проблема предсуществующего иммунного ответа для этого вирусного вектора не стоит. Однако существенным недостатком вакцинного вектора NDV является то, что последствия введения рекомбинантных NDV недостаточно изучены, и не ясно, безопасны ли гриппозные вакцины на основе NDV для человека. Кроме того, NDV характеризуется низкой пакующей емкостью и сложностью получения векторов, несущих несколько целевых антигенов. Препаративные количества NDV получают в куриных эмбрионах, что, как отмечено выше, имеет ряд недостатков [68].

**Рекомбинантные аденовирусы.** Рекомбинантные аденовирусы (Adenoviridae) – наиболее хорошо изученные и наиболее часто используемые рекомбинантные вирусные векторы. Вирионы аденовирусов состоят из молекулы двухцепочечной ДНК, окруженной белковым капсидом.

Многие типы аденовирусов подробно охарактеризованы, в том числе и на генетическом уровне. Нуклеотидная последовательность геномов большинства из них полностью расшифрована. Подробные данные о структуре, физико-химических и биологических свойствах аденовирусов позволяют использовать их для создания рекомбинантных вакцин и генно-терапевтических препаратов [61]. Среди генетических вакцин, проходящих клинические испытания, на долю вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов приходится около 24% (clinicaltrials.gov) (рис. 4).

Аденовирусы обладают такими важными для вакцинных векторов свойствами, как способность обеспечивать высокий уровень экспрессии целевого трансгена в клетке-мишени и трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки.



**Рис. 4.** Схема получения рекомбинантных аденовирусов. А – Получение геномной ДНК рекомбинантного аденовируса человека, несущей гены вируса гриппа, с помощью генно-инженерных методов; Б – трансфекция перmissive линии клеток ДНК рекомбинантного вируса; В – экспрессия вирусных генов в клетках и сборка рекомбинантных аденовирусных частиц; Г – очистка аденовирусных вирионов из суспензии клеток

При этом ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме. Аденовирусы способны накапливаться в культуре клеток в высоких титрах. Процесс получения нового рекомбинантного аденовируса занимает несколько недель, что может позволить реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку в максимально сжатые сроки [61].

В настоящее время на основе рекомбинантных аденовирусов ведется разработка вакцин против многих патогенов, вызывающих такие заболевания, как малярия, туберкулез, бруцеллез и др. [69, 70], и различных вирусов (вирус гриппа А, вирус иммунодефицита человека, папилломавирус человека, вирус бешенства, вирус Эбола и др.) [71–74].

Наиболее изученный представитель аденовирусов – аденовирус человека пятого серотипа (Ad5), является самым популярным среди аденовирусов объектом для создания рекомбинантных вирусных векторов [75, 76].

Для получения вакцин и генно-терапевтических препаратов используют дефектные по репликации Ad5. У таких Ad5 делетированы различные области генома (E1, E2, E3, E4), необходимые для репликации вируса. Для получения и накопления таких вирусов созданы клеточные линии, комплементирующие функции удаленных областей *in trans*. Эти векторы позволяют встраивать до 10000 п.н. [77].

При введении в организм аденовирусы способны активировать рецепторы TLR-9 и RIG-1. Одновременно активация врожденного иммунитета происходит и в результате проникновения аденовирусов в антигенпредставляющие клетки [78].

Трансдуцированные аденовирусом дендритные клетки, экспрессирующие целевой антиген, или активированные дендритные клетки, захватившие антиген, продуцируемый эпителиальными клетками, служат связующим звеном между системами врожденного и адаптивного иммунитета. При мукозальной иммунизации праймирование дендритных клеток происходит в мукозных тканях, поэтому активированные Т- и В-лимфоциты, как и образующиеся из них клетки памяти, приобретают способность экспрессировать  $\alpha 4\beta 7$ -интегрин. Эта молекула позволяет Т- и В-лимфоцитам мигрировать через слой эндотелия в подслизистую, к месту возможного контакта с патогеном [79].

В опытах на лабораторных животных показано, что при мукозальной иммунизации вакцинами различных типов развивается перекрестный иммунитет [80]. Основной компонент адаптивного иммунитета слизистых оболочек – антитела, относящиеся, главным образом, к секреторному иммуноглобулину А (sIgA), в меньшей степени, к секреторному иммуноглобулину М (sIgM), а также к IgG как плазменного, так и местного происхождения. Экспрессия sIgA, возможно, определяет перекрестную протективность вакцины [81]. К другим преимуществам мукозальных вакцин перед инъекционными относятся отсутствие повреждения кожных покровов во время иммунизации, а также более низкая реактогенность [82].

Благодаря активации врожденного иммунного ответа интраназальное введение мышам рекомбинантного Ad5, не несущего трансгена, также способно защищать от вируса гриппа А, так как индуцирует продукцию широкого спектра противовоспалительных цитокинов и хемокинов, включая интерфероны типа I, а также оксида азота, активирует натуральные киллерные клетки (НК). Протективные эффекты, вызванные введением Ad5, не несущего трансген, сохраняются как минимум в течение 3 нед. после однократной интраназальной иммунизации. Введение рекомбинантного аденовируса обеспечивает неспецифическую защиту от невысоких доз вируса гриппа в течение времени, необходимого для формирования адаптивного иммунного ответа на целевые антигены. Таким образом, протективное действие вакцин на основе Ad5 начинается практически с первых дней после иммунизации [83], а его длительность, уже за счет специфического иммунного ответа на трансген, составляет более 6 мес.

В настоящее время в различных странах ведутся разработки вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов против различных серотипов вируса гриппа А. Одна из таких вакцин успешно прошла первую стадию клинических испытаний в США, оказалась безопасной для человека и высокоиммуногенной по отношению к вирусу гриппа А H5N2 [84].

Проблема создания гриппозных вакцин, формирующих гетеросубтипический иммунитет, способный защитить от различных вариантов вируса гриппа, актуальна, и в последние годы появились новые подходы для ее разрешения. Выявлены консервативные для различных субтипов вируса гриппа А конформационные эпитопы HA, на которые могут вырабатываться антитела широкого спектра действия как после перенесенной инфекции, так и при иммунизации живыми вакцинами [85]. Иммунизация рекомбинантными аденовирусными векторами имитирует заражение клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей, обеспечивая экспрессию антигенов с нативной третичной структурой, что позволяет индуцировать образование таких перекрестных антител. Рекомбинантные аденовирусные вакцины также способны формировать сильный Т-клеточный иммунный ответ, который характеризуется более широким, чем гуморальный, спектром действия.

В лаборатории молекулярной биотехнологии НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи изучена возможность индукции рекомбинантным Ad5 гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа А. Показано, что двукратная интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусом, несущим ген HA вируса гриппа А H5N2, обеспечивает высокий уровень индукции специфических антител к этому вирусу и полную защиту мышей от заражения летальной дозой вируса H5N2 (50 ЛД<sub>50</sub>) [86]. Мыши, иммунизированные таким рекомбинантным аденовирусом, были защищены и от заражения вирусами гриппа H1N1 и H2N3, которые относятся к группе H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16), но не были защищены от заражения вирусом гриппа H3N2, принадлежащим к группе H3 (H3, H14 и H4) [87, 80].

Полученные данные позволяют предположить, что, используя панель аденовирусных векторов, несущих гены HA вирусов гриппа А из различных групп, можно создать вакцину, обеспечивающую защиту от большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А.

Применение Ad5 как вектора для создания вакцин имеет серьезный недостаток – наличие антител к Ad5 у большей части населения. Присутствие таких антител может существенно снизить эффективность иммунизации. Однако ряд исследований показывает, что при интраназальной иммунизации (в отли-

чие от парентерального введения) вакцины на основе Ad5 могут избегать воздействия предсуществующего иммунного ответа [88–90]. Интраназальное введение Ad5 приводит к эффективной доставке трансгена через мукозальный барьер. Даже однократное интраназальное введение вакцин на основе Ad5 приводит к пролонгированной *ex vivo*-экспрессии трансгена, несмотря на предсуществующий иммунитет как у лабораторных животных, так и у приматов [89]. Однократная интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусным вектором, несущим ген HA вируса гриппа А птиц H5N2, обеспечивала защиту иммунизированных животных от заражения вирусом гриппа А птиц H5N2. При этом не наблюдалось различий в уровне защиты мышей, в крови которых присутствовали вируснейтрализующие антитела к Ad5, и наивных по отношению к Ad5 мышей [80].

Интраназальная иммунизация мышей с предсуществующим иммунным ответом на Ad4, рекомбинантным Ad4, несущим ген HA вируса гриппа, приводила к более низкому уровню продукции антител к вирусу гриппа, чем у непраймированных мышей и снижению клеточного иммунного ответа в 2 и более раз (в зависимости от дозы рекомбинантного Ad4). Однако независимо от предсуществующего иммунитета животные были полностью защищены от заражения летальной дозой вируса гриппа [74]. Аналогичные данные получены для Ad5, несущего гены HA и NP вируса гриппа. Повышение дозы рекомбинантного аденовируса нивелировало снижение иммунного ответа [90].

Включение в состав вектора элементов, позволяющих оптимизировать уровень экспрессии трансгена, и подбор оптимальной дозы Ad5 позволяли добиться значимого уровня трансгенспецифических CD8<sup>+</sup>-клеток у иммунизированных животных даже при высоких уровнях Ad5-нейтрализующих предсуществующих антител [91].

Таким образом, рекомбинантные Ad5, несущие гены различных антигенов вируса гриппа А, весьма перспективны в качестве потенциальных противогриппозных вакцин. Они безопасны, эффективны и могут служить основой для создания универсальной интраназальной вакцины против гриппа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о широкомасштабных работах, направленных на конструирование гриппозных вакцин при помощи новых подходов, использующих возможности обратной генетики и рекомбинантные технологии, а также о получении ВПЧ, протеосом и субъединичных вакцин в различных системах экспрессии.

Новые подходы позволили существенно продвигаться в создании гриппозных вакцин нового типа. Некоторые из этих вакцин в настоящее время проходят либо доклинические исследования, либо клинические испытания. Среди векторов, используемых для создания генетических вакцин, особое место занимают аденовирусные векторы. Они эффективно проникают в клетки слизистой оболочки дыхательных путей, что позволяет проводить мукозальную иммунизацию, обеспечивая длительную персистенцию антигена в организме и активацию врожденного иммунитета. Рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены различных антигенов вируса гриппа А, перспективны в качестве противогриппозных вакцин. Они безопасны, эффективны

и могут служить основой для создания универсальной интраназальной вакцины против гриппа. Рекомбинантный аденовирус при иммунизации действует как адъювант, он способен бустировать иммунитет в отношении трансгена. Процесс получения такой вакцины занимает несколько недель, что позволяет быстро реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку. Рекомбинантные аденовирусные векторы, несущие гены НА вирусов гриппа А различных подтипов, можно использовать для формирования гетеросубтипического иммунного ответа против большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А. Таким образом, аденовирусы могут стать основой для создания универсальной гриппозной рекомбинантной вакцины. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Girard M., Cherian T., Pervikov Y., Kieny M. // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 50. P. 5708–5724.
- Taubenberger J., Morens D. // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. V. 12. № 1. P. 15–22.
- Гендон Ю.З. // *Вопр. вирусол.* 2007. Т. 52. № 1. С. 4–10.
- Киселев О.И. // *Биотехнология*. 2010. № 2. С. 1–18.
- Bodewes R., Osterhaus A., Rimmelzwaan G. // *Viruses*. 2010. V. 2. P. 166–188.
- Nichol K. // *Vaccine*. 2001. V. 19. № 31. P. 4373–4377.
- Swayne D. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1081. P. 226–227.
- Mahmud M., Maassab H., Jennings R., Potter C. // *Arch. Virol.* 1979. V. 61. № 3. P. 207–216.
- Snyder M., Clements M., Betts R., Dolin R., Buckler-White A., Tierney E., Murphy B. // *J. Clin. Microbiol.* 1986. V. 23. № 5. P. 852–857.
- Plotkin S. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. V. 16. № 12. P. 1709–1719.
- Tumpey T., Basler C., Aguilar P., Zeng H., Solórzano A., Swayne D., Cox N., Katz J., Taubenberger J., Palese P., et al. // *Science*. 2005. V. 310. № 5745. P. 77–80.
- Song H., Nieto G., Perez D. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 17. P. 9238–9248.
- Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 22. P. 11115–11123.
- Wacheck V., Egorov A., Groiss F., Pfeiffer A., Fuehrer T., Hoeflmayer D., Kundi M., Popow-Kraupp T., Redlberger-Fritz M., Mueller C., et al. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 3. P. 354–362.
- Watanabe T., Watanabe S., Kim J., Hatta M., Kawaoka Y. // *J. Virol.* 2007. V. 82. № 5. P. 2486–2492.
- Middleton D., Bingham J., Selleck P., Lowther S., Gleeson L., Lehrbach P., Robinson S., Rodenberg J., Kumar M., Andrew M. // *Virology*. 2007. V. 359. № 1. P. 66–71.
- Harvey R., Wheeler J., Wallis C., Robertson J., Engelhardt O. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 51. P. 6550–6554.
- Васильев Ю. // *Вопр. вирусол.* 2008. Т. 6. № 1. С. 4–15.
- Киселев О., Цыбалова Л.М., Покровский В. // *Журн. микробиол.* 2006. Т. 5. С. 28–38.
- Wang C., Luo Y., Chen Y., Li S., Lin C., Hsieh Y., Liu H. // *J. Virol. Methods*. 2007. V. 146. № 1–2. P. 293–297.
- Deroo T., Jou W., Fiers W. // *Vaccine*. 1996. V. 14. № 6. P. 561–569.
- Lin S., Huang M., Tsou P., Huang L., Chong P., Wu S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 5. e20052.
- Цыбалова Л.М., Киселев О.И. // *Вопр. вирусол.* 2012. Т. 57. № 1. С. 9–14.
- Nemchinov L., Natilla A. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 56. P. 153–159.
- Huleatt J., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 2. P. 201–214.
- Turley C., Rupp R., Johnson C., Taylor D., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 32. P. 5145–5152.
- Ebrahimi S., Dabaghian M., Tebianian M., Zabeh Jazi M. // *Virology*. 2012. V. 430. № 1. P. 63–72.
- Latha T., Galarza J. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 13. P. 6154–6165.
- Chen B., Leser G., Morita E., Lamb R. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 13. P. 7111–7123.
- Galarza J., Latham T., Cupo A. // *Viral. Immunol.* 2005. V. 18. № 2. P. 365–367.
- Bright R., Carter D., Daniluk S., Toapanta F., Ahmad A., Gavrilov V., Massare M., Pushko P., Mytle N., Rowe T., et al. // *Vaccine*. 2007. V. 25. № 19. P. 3871–3878.
- López-Macías C. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012. V. 8. № 3. P. 411–414.
- Tang X., Lu H., Ross T. // *Viral. Immunol.* 2011. V. 24. № 4. P. 311–319.
- Wang B., Quan F., Kang S., Bozja J., Skountzou I., Compans R. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 23. P. 11813–11823.
- Fender P., Ruigrok R., Gout E., Buffet S., Chroboczek J. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 1. P. 52–56.
- Matic S., Rinaldi R., Masenga V., Noris E. // *BMC Biotechnol.* 2011. V. 11. № 1. P. 106.
- De Filette M., Martens W., Smet A., Schotsaert M., Birkett A., Londoño-Arcila P., Fiers W., Saelens X. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 51. P. 6503–6507.
- Naskalska A., Szolajska E., Chaperot L., Angel J., Plumas J., Chroboczek J. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 52. P. 7385–7393.
- Bessa J., Schmitz N., Hinton H., Schwarz K., Jegerlehner A., Bachmann M. // *Eur. J. Immunol.* 2008. V. 38. № 1. P. 114–126.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Lopez Macias C., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 27–28. P. 3395–3403.
- Ameiss K., Ashraf S., Kong W., Pekosz A., Wu W.H., Milich

- D., Billaud J., Curtiss R. 3rd. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 41. P. 6704–6713.
42. Ravin N.V., Kotlyarov R.Y., Mardanov E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2012. V. 77. № 1. P. 33–40.
43. Bessis N., GarciaCozar F., Boissier M. // *Gene Ther.* 2004. V. 11. Suppl 1. S. 10–17.
44. Abdulhaqq S., Weiner D. // *Immunol. Res.* 2008. V. 42. P. 219–232.
45. Smith L., Wloch M., Ye M., Reyes L., Boutsaboualoy S., Dunne C., Chaplin J., Rusalov D., Rolland A., Fisher C., et al. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 13. P. 2565–2572.
46. Ding H., Tsai C., Gutiérrez R.A., Zhou F., Buchy P., Deubel V., Zhou P. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e16563.
47. Suguitan A.L. Jr., Cheng X., Wang W., Wang S., Jin H., Lu S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. e21942.
48. Guo J., Yao L., Chen A., Liu X., Fu J., Xu P., Zhang Z. // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2011. V. 27. № 6. P. 876–883.
49. Stoeker L., Nordone S., Gunderson S., Zhang L., Kajikawa A., LaVoy A., Miller M., Klaenhammer T., Dean G. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011. V. 18. № 11. P. 1834–1844.
50. Ikonomidis G., Portnoy D.A., Gerhard W., Paterson Y. // *Vaccine*. 1997. V. 15. № 4. P. 433–440.
51. Johnson P., Blair B., Zeller S., Kotton C., Hohmann E. // *Microbiol. Immunol.* 2011. V. 55. № 5. P. 304–317.
52. Li R., Lim A., Ow S., Phoon M., Loch C., Chow V., Alonso S. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 33. P. 5502–5511.
53. Hense M., Domann E., Krusch S., Wachholz P., Dittmar K., Rohde M., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S. // *Cell Microbiol.* 2001. V. 3. № 9. P. 599–609.
54. Draper S., Heeney J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 62–73.
55. Wei C., Boyington J., McTamney P., Kong W., Pearce M., Xu L., Andersen H., Rao S., Tumpey T., Yang Z., et al. // *Science*. 2010. V. 329. P. 1060–1064.
56. Тухватулин А.И., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Народицкий Б.С. // *Вест. ПАН. 2011. № 10. С. 47–54.*
57. Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tuxhvatulina A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2011. V. 89. № 4. P. 331–341.
58. Kopecky-Bromberg S., Palese P. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. V. 333. P. 243–267.
59. Gherardi M., Esteban M. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. № 11. P. 2925–2936.
60. Nakaya T., Cros J., Park M., Nakaya Y., Zheng H., Sagrera A., Villar E., Garcia-Sastre A., Palese P. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 23. P. 11868–11873.
61. Карпов А., Тутыхина И., Логунов Д., Верховская Л., Шмаров М., Валихов А.Ф., Шульпин М.И., Дрыгин В.В., Народицкий Б.С. // *Биотехнология*. 2007. Т. 5. С. 38–44.
62. Pantaleo G., Esteban M., Jacobs V., Tartaglia J. // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010. V. 5. № 5. P. 391–396.
63. Hessel A., Schwendinger M., Holzer G., Orlinger K., Coulibaly S., Savidis-Dacho H., Zips M., Crowe B., Kreil T., Ehrlich H., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e16247.
64. Kreijtz J., Süzer Y., Bodewes R., Schwantes A., van Amerongen G., Verburgh R., de Mutsert G., van den Brand J., van Trierum S., Kuiken T., et al. // *J. Gen. Virol.* 2010. V. 91. Pt 11. P. 2745–2752.
65. Kyriakis C., De Vleeschauwer A., Barbé F., Bublot M., van Reeth K. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 16. P. 2258–2264.
66. Webster R., Kawaoka Y., Taylor J., Weinberg R., Paoletti E. // *Vaccine*. 1991. V. 9. № 5. P. 303–308.
67. Ge J., Deng G., Wen Z., Tian G., Wang Y., Shi J., Wang X., Li Y., Hu S., Jiang Y., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 1. P. 150–158.
68. Xie Y., Sun H., Li D. // *Chem. Biodivers.* 2010. V. 7. № 3. P. 677–689.
69. Radosevic K., Rodriguez A., Lemckert A., van der Meer M., Gillissen G., Warnar C., von Eyben R., Pau M., Goudsmit J. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2010. V. 17. № 11. P. 16876–16894.
70. Ronan E., Lee L., Beverley P., Tchilian E. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 12. e8235.
71. Vemula S., Mittal S. // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010. V. 10. № 10. P. 1469–1487.
72. Paris R., Kim J., Robb M., Michael N. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2010. V. 9. № 9. P. 1055–1069.
73. Knowles M., Roberts D., Craig S., Sheen M., Nadin-Davis S., Wandeler A. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 20. P. 2662–2668.
74. Alexander J., Ward S., Mendy J., Manayani D., Farness P., Avanzini J., Guenther B., Garduno F., Jow L., Snarsky V., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. e31177.
75. Рогожин В.Н., Белоусова Р.В., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Лунин В.Г., Народицкий Б.С. // *Ветеринарная медицина*. 2011. № 2. С. 10–13.
76. Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тутыхина И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 3 (10). С. 66–72.
77. Gao G., Yang Y., Wilson J. // *J. Virol.* 1996. V. 70. № 12. P. 8934–8943.
78. Тутыхина И.Л., Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С. // *Вест. ПАН. 2011. № 10. С. 37–49.*
79. Tamura S., Asanuma H., Ito Y., Hirabayashi Y., Suzuki Y., Nagamine T., Aizawa C., Kurata T., Oya A. // *Eur. J. Immunol.* 1992. V. 22. № 2. P. 477–481.
80. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Неугодова Г.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Биопрепараты*. 2011. № 1. С. 31–35.
81. Roy C., Ault A., Sivasubramani S., Gorres J., Wei C., Andersen H., Gall J., Roederer M., Rao S. // *Respir. Res.* 2011. V. 12. P. 153.
82. Ugwoke M., Agu R., Verbeke N., Kinget R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. № 11. P. 1640–1665.
83. Zhang J., Tarbet E., Toro H., Tang D.C. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2011. V. 10. № 11. P. 1539–1552.
84. van Kampen K., Shi Z., Gao P., Zhang J., Foster K., Chen D., Marks D., Elmetts C., Tang D.C. // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 8. P. 1029–1036.
85. Sahini L., Tempczyk-Russell A., Agarwal R. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2. e9268.
86. Седова Е.С., Шмаров М.М., Тутыхина И.Л., Барыков Ю.А., Верховская Л.В., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Журн. микробиол.* 2010. № 3. С. 44–48.
87. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 1 (4). С. 119–126.
88. Croyle M., Patel A., Tran K., Gray M., Zhang Y., Strong J., Feldmann H., Kobinger G. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 10. e3548.
89. Zabner J., Petersen D., Puga A., Graham S.M., Couture L., Keyes L., Lukason M., St. George J., Gregory R., Smith A. // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. № 1. P. 75–83.
90. Pandey A., Singh N., Vemula S., Couët L., Katz J., Donis R., Sambhara S., Mittal S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e33428.
91. Steffensen M., Jensen B., Holst P., Bassi M., Christensen J., Thomsen A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. e34884.

УДК 57.017.642:576.3+602.9:577.112.823

# Эпигенетика плюрипотентных клеток

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

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

Поступила в редакцию 08.08.2012

**РЕФЕРАТ** Плюрипотентность клеток поддерживается сложнейшей системой, включающей генетический и эпигенетический уровни. Исследования последних лет показывают, что генетический уровень, включающий транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК, тесно взаимодействует с системой ферментов и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Взаимодействие этих двух систем формирует уникальное состояние хроматина, существующее в плюрипотентных клетках. В представленном обзоре рассмотрены особенности эпигенетики эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Особое внимание уделено взаимодействию транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG с белками группы Polycomb и другими молекулами, участвующими в регуляции структуры хроматина. Обсуждено участие транскрипционных факторов системы поддержания плюрипотентности в процессе инактивации X-хромосомы. Рассмотрены также эпигенетические события, происходящие при репрограммировании соматических клеток к плюрипотентному состоянию, и проблемы, связанные с «эпигенетической памятью».

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ковалентные модификации гистонов, метилирование ДНК, плюрипотентность, эмбриональные стволовые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДМО – дифференциально метилированные области; ВКМ – внутренняя клеточная масса; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентность – это свойство клеток дифференцироваться в производные всех трех первичных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы, а также образовывать во время эмбрионального развития клетки-предшественники функциональных гамет. Плюрипотентными являются клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и эпибласта предимплантационных эмбрионов млекопитающих [1]. В онтогенезе из плюрипотентных клеток формируется взрослый организм. Однако эти клетки не способны дать начало внезародышевым органам и тканям.

Из клеток внутренней клеточной массы предимплантационных эмбрионов получают эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [2–4]. При сохранении оптимальных условий культивирования ЭСК в течение продолжительного времени могут сохранять ряд свойств, присущих клеткам внутренней клеточной массы и эпибласта эмбриона, в том числе плюрипо-

тентность [2–4]. Плюрипотентность ЭСК делает их перспективными объектами для фундаментальных и прикладных исследований. ЭСК используют в качестве модельных систем при изучении процессов, происходящих в раннем эмбриогенезе млекопитающих, а также для моделирования заболеваний *in vitro*. Кроме того, плюрипотентные клетки служат перспективным источником материала для заместительной клеточной терапии [5–7].

После того как были получены первые линии ЭСК мыши и человека, началось изучение молекулярно-генетических основ поддержания недифференцированного, плюрипотентного состояния ЭСК. На сегодняшний день известно, что поддержание плюрипотентного статуса клеток предимплантационных эмбрионов и ЭСК обеспечивается сложной системой поверхностных клеточных белков, их молекулярных сигнальных путей и транскрипционных факторов, инициирующих транскрипцию генов-мишеней. Подсистема так называемых «внешних

регуляторов плюрипотентности» включает в себя несколько сигнальных путей, основными из которых являются каскады, запускаемые белками LIF, BMP4, TGF $\beta$ , активином A, NODAL и bFGF (FGF2) [1].

Другая подсистема, регулирующая плюрипотентность ЭСК, – подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности» – транскрипционных факторов, действующих в ядрах клеток. К числу ключевых регуляторов в данной подсистеме относятся факторы OCT4, NANOG и SOX2 [8, 9].

В 2006 году группа японских ученых опубликовала в журнале «Cell» результаты своих экспериментов по репрограммированию соматических клеток мыши в плюрипотентное состояние [10]. Это стало одним из наиболее ярких открытий последнего десятилетия в области клеточной биологии. Клетки, полученные в результате репрограммирования соматических клеток, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) [10].

Развитие технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток животных и человека открыло новые возможности изучения динамики эпигенетических событий, происходящих при репрограммировании, и особенностей эпигеномов плюрипотентных клеток. К настоящему времени известно множество хорошо воспроизводимых способов получения ИПСК из широкого спектра соматических клеток. Большая часть исследователей используют для репрограммирования определенный набор генов, большинство из которых кодируют факторы транскрипции. Это такие гены, как *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* и *Lin28* [10–13]. Кроме того, показано, что ИПСК мыши и человека можно получить с помощью микроРНК [14, 15]. ИПСК успешно получены из соматических клеток различного типа. Впервые ИПСК получили из фибробластов различного происхождения, позже из кератиноцитов, меланоцитов, клеток крови, нейтральных стволовых клеток,  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, В-лимфоцитов и других клеток [16–22]. Таким образом, можно заключить, что ИПСК могут быть получены из клеток, происходящих из всех трех первичных зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), хотя эффективность и динамика получения стабильных линий ИПСК существенно зависят от использованного способа и типа соматических клеток [14, 23]. ИПСК, получающиеся в результате прямого репрограммирования, имеют ряд общих свойств, что делает их столь перспективными моделями для исследований в области биологии плюрипотентных клеток, а также дает возможность использовать эти клетки для моделирования заболеваний человека и в регенеративной медицине [6, 7]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки по своим свойствам очень близки

к эмбриональным стволовым клеткам, которые получают из предимплантационных эмбрионов мыши и человека. Клетки этих двух типов обладают сходной морфологией, чувствительностью к факторам роста и сигнальным молекулам, паттерну экспрессии генов и дифференцировки [24]. В частности, ИПСК могут образовывать при дифференцировке *in vitro* эмбрионидные тельца, состоящие из производных всех трех зародышевых листков. Кроме того, ИПСК человека могут образовывать тератомы, а ИПСК мыши дают химеры, а при инъекции в тетраплоидные бластоцисты даже способны формировать целый организм [25–27]. Совершенно очевидно, что все эти свойства, характерные для плюрипотентных клеток, определяются особым состоянием эпигенома, которое у ЭСК «наследуется» от клеток внутренней клеточной массы эмбрионов, а в случае ИПСК формируется в процессе репрограммирования.

Исследования последних лет показывают, что транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК тесно взаимодействуют с системой ферментов и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Это взаимодействие формирует уникальное состояние хроматина в плюрипотентных клетках.

В данном обзоре рассмотрены особенности эпигеномов эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Особое внимание уделено взаимодействию транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG с белками группы Polycomb и другими молекулами, участвующими в регуляции структуры хроматина. Обсуждено участие транскрипционных факторов системы поддержания плюрипотентности в процессе инактивации X-хромосомы. Кроме того, рассмотрены эпигенетические события, происходящие при репрограммировании соматических клеток к плюрипотентному состоянию, и проблемы, связанные с «эпигенетической памятью».

### **БИВАЛЕНТНЫЕ ДОМЕНЫ ХРОМАТИНА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК**

Бивалентными доменами называют области хроматина, обогащенные одновременно метками активного и неактивного хроматина – H3K4me3 и H3K27me3 [28]. Эти домены обнаружены в ЭСК мыши и человека [28–31]. Гены, точки старта транскрипции которых ассоциированы с бивалентными доменами, характеризуются низким уровнем транскрипции, несмотря на присутствие метки активного хроматина H3K4me3, что говорит о «доминировании» H3K27me3 над H3K4me3. В бивалентных доменах обнаружен высокий уровень варианта H2AZ гистона H2A [32]. Большинство бивалентных доменов ас-

социированы с точками начала транскрипции генов, связанных с развитием, например, транскрипционных факторов семейств HOX, SOX, FOX, PAX, IRX и POU [28]. В ходе дифференцировки большинство бивалентных доменов превращаются в моновалентные, содержащие либо H3K27me3, либо H3K4me3, в зависимости от типа дифференцированных производных [28, 33]. Однако часть доменов остается в бивалентном состоянии и присутствует в эпигеномах клеток-предшественников [33, 34]. В целом существование бивалентных доменов и сохранение меток активного хроматина в промоторных областях генов, вовлеченных в поддержание недифференцированного состояния, позволяют быстро переключать программу транскрипции генов при дифференцировке в те или иные производные.

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ С БЕЛКАМИ ГРУППЫ POLYCOMB И ФАКТОРАМИ, РЕМОДЕЛИРУЮЩИМИ ХРОМАТИН**

Существование в ЭСК так называемого «открытого» хроматина и одновременная надежная репрессия генов дифференцировки обеспечиваются системой взаимодействий как на уровне белок–ДНК, так и на уровне белок–белок. Изучение протеома плюрипотентных клеток и, в частности, белков, образующих основную систему поддержания плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2), показало, что белки не только взаимодействуют между собой, регулируя транскрипцию множества генов, но и образуют сложную сеть взаимодействий с другими транскрипционными факторами и белками, участвующими в модификациях и ремоделировании хроматина. Белки, вовлеченные в поддержание плюрипотентности, взаимодействуют с компонентами таких белковых комплексов, как PRC1 и 2, BAF, NuRD и др. [35–38].

### **БЕЛКИ ГРУППЫ POLYCOMB. КОМПЛЕКСЫ PRC1 И 2**

Белки группы Polycomb – эволюционно консервативное семейство регуляторов структуры хроматина. Функция белков этой группы заключается в установлении и поддержании транскрипционного сайленсинга гомеозисных генов [39–41].

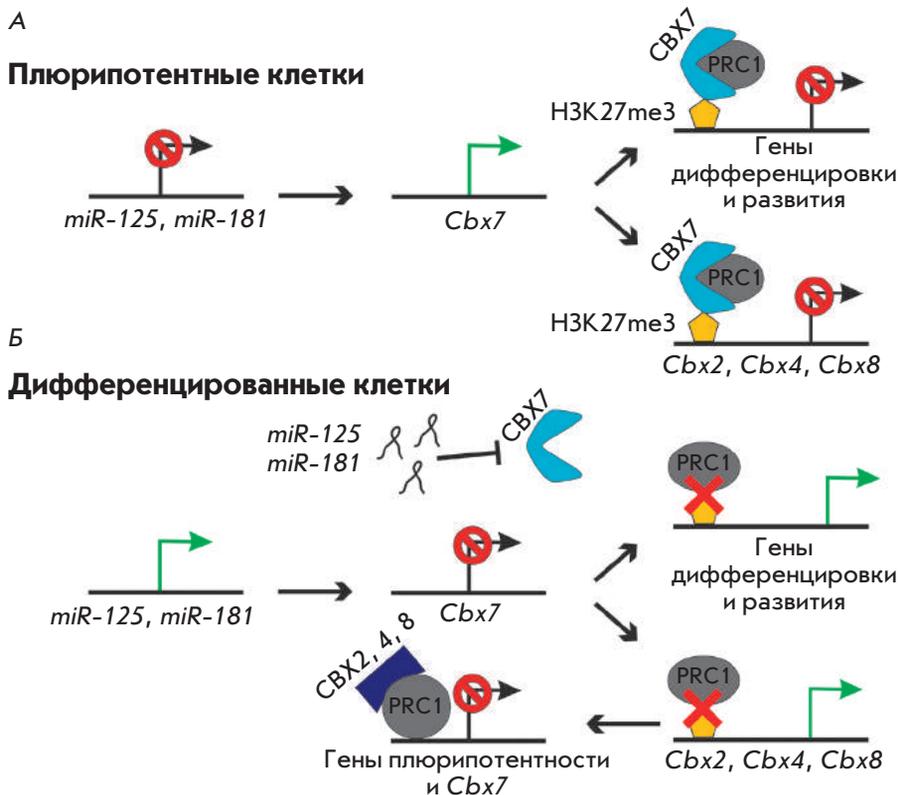
У млекопитающих известно два комплекса, относящихся к семейству Polycomb: PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) и PRC2, которые выполняют важнейшие функции в эмбриональном развитии, а также в поддержании самообновления и нормальной дифференцировки стволовых клеток.

Комплекс PRC1 млекопитающих состоит из нескольких субъединиц, гомологи которых имеются у дрозофилы: CBX1, 2 и 3, MEL18, BMI1, RING1A

(RING1), RING1B (RNF2) и PRC1, 2 и 3. Функцией PRC1 считается поддержание генов в репрессированном состоянии, которое первоначально устанавливается комплексом PRC2. Реализуется данная функция благодаря активности субъединиц RING1A и 1B, которые являются E3-лигазами и осуществляют моноубиквитинирование гистона H2A в положении K119 (H2AK119Ub1) [42–44]. Мыши с мутациями в генах субъединицы PRC1 (кроме RING1B) остаются жизнеспособными, что может говорить о существовании дублирующих механизмов либо об избыточности функции PRC1 для нормальной регуляции эмбрионального развития [45]. Однако установлено, что компоненты комплекса PRC1, например BMI1, необходимы для функционирования нескольких типов региональных стволовых клеток (гемопоэтических, нейтральных, стволовых клеток легких и кишечника) [46–49]. Интересно, что функция BMI1 и PRC1 в региональных стволовых клетках сводится, по всей видимости, к контролю системы регуляции уровня активных форм кислорода в митохондриях [50]. Кроме того, отсутствие RING1A и 1B вызывает спонтанную дифференцировку ЭСК мыши и активацию генов, связанных с дифференцировкой клеток и развитием. Интересно, что промоторы большого числа генов, репрессируемых PRC1, связываются с транскрипционным фактором OCT4, который также принимает участие в репрессии транскрипции этих генов. При этом связывание PRC1 с генами-мишенями зависит от OCT4, тогда как связывание OCT4, напротив, не зависит от PRC1 [51]. Протеомные исследования показывают, что RING1B (RNF2) физически взаимодействует с транскрипционным фактором NANOG в ЭСК [37]. Эти факты указывают на тесную связь между системой транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентность, и системой регуляторов структуры хроматина, в частности PRC1.

Недавно была обнаружена новая функция белков CBX, компонентов комплекса PRC1, в регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК мыши [52, 53] (рис. 1). У млекопитающих известно пять белков CBX, ассоциированных с PRC1 – CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 и CBX8 [54]. С использованием методов ChIP-Seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием обогащенной ДНК) и коиммунопреципитации было показано, что в недифференцированных ЭСК мыши 97% сайтов связывания белка CBX7 содержат комплексы PRC1 и PRC2, а 86% из них также маркированы H3K27me3. Несколько сайтов, расположенных в пределах генов, связаны с развитием, например, сайты в кластере генов семейства HOX [52].

При помощи количественного протеомного анализа также показано, что в недифференцированных ЭСК



**Рис. 1.** Модель, иллюстрирующая роль белков СВХ в регуляции функции PRC1 в плюрипотентных клетках и при дифференцировке. А – В плюрипотентных клетках комплекс СВХ7/PRC1 связывается с регуляторными областями генов, связанных с развитием и дифференцировкой, а также генов, кодирующих белки СВХ2, 4 и 8, подавляя их транскрипцию. При этом связывание комплекса зависит от присутствия метки H3K27me3, устанавливаемой комплексом PRC2. Б – Во время дифференцировки активируется экспрессия микроРНК *miR-125* и *miR-181*, которые подавляют экспрессию СВХ7. Исчезновение комплекса СВХ7/PRC1 вызывает активацию генов дифференцировки, а также генов *Cbx2*, 4 и 8. Комплекс PRC1 с белками СВХ2, СВХ4 и СВХ8 подавляет транскрипцию генов, ответственных за поддержание плюрипотентности, и гена *Cbx7* [55]

мышь только СВХ7 сококалится с H3K27me3, в то время как в дифференцированных клетках и фибробластах с данной модификацией гистона взаимодействуют СВХ2 и СВХ8 [53]. Кроме того, методом иммунопреципитации хроматина установлено, что СВХ7 в комплексе с PRC1 взаимодействует с промоторами генов *Cbx2*, *Cbx4* и *Cbx8*, подавляя их транскрипцию в ЭСК [52]. Во время дифференцировки, напротив, в комплекс с PRC1 вступают СВХ2, СВХ4 и СВХ8, которые могут участвовать в репрессии *Cbx7* [52, 53]. Подавление экспрессии *Cbx7* в ЭСК приводит к повышению экспрессии генов *Cbx2*, *Cbx4* и *Cbx8*, нарушению морфологии ЭСК и спонтанной дифференцировке. Эктопическая повышенная экспрессия *Cbx7* подавляет дифференцировку и инактивацию X-хромосомы в клетках самок, а также усиливает их самообновление [53]. Кроме того, в подавлении транскрипции *Cbx7* участвуют микроРНК *miR-125* и *miR-181*, что подтверждает важную роль микроРНК в регуляции действия белков Polycomb [53]. Таким образом, в регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК принимает участие динамическая система комплексов PRC1 с белками СВХ, которые взаимно регулируют друг друга. Действие этих комплексов контролируется PRC2 (H3K27me3), а их комбинации меняются в зависимости от статуса клетки (рис. 1).

Белковый комплекс PRC2 млекопитающих содержит субъединицы EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12) и EZH1 (Enhancer of Zeste 1) или EZH2 (Enhancer of Zeste 2). Субъединица EZH2 – белок с SET-доменом, который входит в состав белков, функционирующих как гистон-метилтрансферазы, осуществляя ди- и триметилирование остатка K27 гистона H3 (H3K27me2/3). В отличие от PRC1, мутации генов субъединиц PRC2 вызывают значительные нарушения эмбрионального развития и приводят к гибели эмбриона [45, 56, 57]. Например, в эмбрионах, мутантных по гену *Eed*, отсутствует метилирование H3K27, нарушена гастрюляция (изменен паттерн первичной полосы в переднезаднем направлении), гипертрофирована внезародышевая мезодерма и недоразвита эмбриональная мезодерма [57, 58]. Однако из мутантных по *Eed* бластоцист можно получить ЭСК, которые обладают свойством плюрипотентности, хотя и склонны к спонтанной дифференцировке [59]. Сходная ситуация отмечена и у мутантов по *Suz12*. Наблюдается гибель эмбрионов мыши, мутантных по *Suz12*, но можно успешно получить ЭСК. Хотя ЭСК, полученные из мутантных эмбрионов, имеют высокий уровень транскрипции генов дифференцировки, они не образуют нейроны при дифференцировке *in vitro* и очень слабо – производные энтодермы при форми-

Эмбриональные стволовые клетки

Дифференцированные клетки

PRC2

PRC1

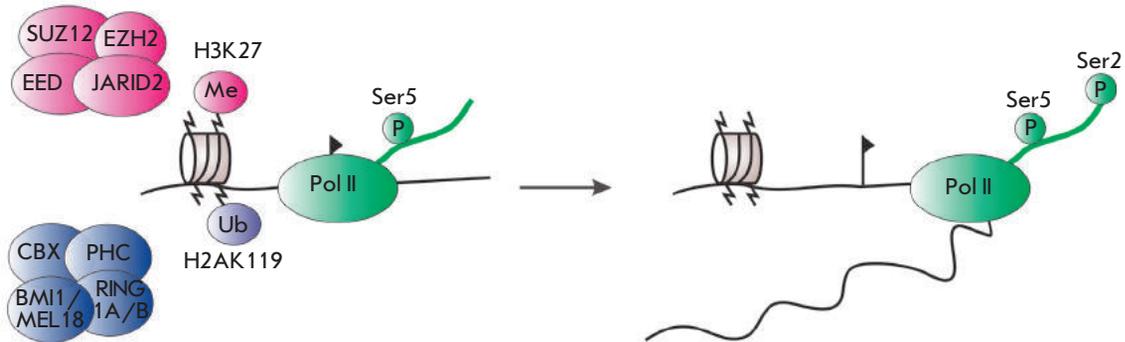


Рис. 2. Белок JARID2 необходим для привлечения Ser5-фосфорилированной формы РНК-полимеразы II в бивалентные домены эпигенома ЭСК мыши. В плюрипотентных клетках формирование «бивалентных доменов» нуждается в присутствии РНК-полимеразы II (Pol II), фосфорилированной по Ser5 (зеленый овал) в промоторных областях генов, экспрессия которых подавляется комплексом PRC2. Субъединицы комплекса PRC2 осуществляют метилирование H3K27, что, в свою очередь, привлекает комплекс PRC1, осуществляющий моноубиквитинирование H2AK119 [68]

ровании эмбрионных теллец [56]. Делеция гена *Ezh2* не приводит к каким-либо изменениям свойств ЭСК, полученных из мутантных эмбрионов, что можно объяснить действием субъединицы EZH1, также обладающей гистон-метилтрансферазной активностью и опосредующей установление метки неактивного хроматина в пределах генов-мишеней PRC2 [60].

Недавно обнаружили, что одной из субъединиц комплекса PRC2 является белок JARID2 из семейства JUMONJI C (JMJC). Белки семейства JUMONJI относятся к гистон-деметилазам, однако JARID2 не обладает такой активностью. Показано, что JARID2 необходим для эффективного связывания PRC1 и PRC2 с промоторами генов-мишеней, а паттерн связывания PRC2 и JARID2 с ДНК генов-мишеней в масштабе генома ЭСК мыши совпадает более чем на 90% [61–66]. Существует множество противоречивых экспериментальных данных о влиянии нокаута или нокдауна гена *Jarid2* на уровень H3K27me3 в промоторах генов-мишеней PRC2. В некоторых работах наблюдали понижение уровня H3K27me3 [63, 65, 66], тогда как сообщается и об отсутствии изменений [61], и о повышении уровня H3K27me3 [62]. Однако показано, что в ЭСК с дефицитом JARID2 нарушен или замедлен процесс дифференцировки, т.е. JARID2 каким-то образом влияет на плюрипотентность [62, 63, 66]. Кроме того, JARID2 совместно с белками MTF2 и esPRC2p48 способен усиливать эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из эмбриональных фибробластов мыши с помощью сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*

и *Klf4*. При этом нокаут генов, кодирующих JARID2, MTF2 и esPRC2p48, напротив, существенно подавляет репрограммирование [67].

Существует несколько гипотез о молекулярных основах влияния JARID2 на плюрипотентность клеток, ни одна из которых пока не нашла достаточных экспериментальных доказательств [68]. Возможно, что основная функция JARID2 заключается не в модулировании гистон-метилтрансферазной активности PRC2, а в привлечении особой иницирующей формы РНК-полимеразы II [66, 68] (рис. 2). У этой формы РНК-полимеразы фосфорилирован остаток серина в пятом положении (Ser5P-RNAP) (в элонгирующей форме фосфорилирован также остаток серина во втором положении), ее присутствие характерно для бивалентных доменов эпигенома, в формировании которых принимают участие PRC1 и PRC2 [69, 70]. По всей видимости, присутствие данной формы полимеразы в пределах промоторов генов, вовлеченных в дифференцировку клеток, необходимо для быстрого и надежного переключения программ транскрипции при запуске процесса дифференцировки.

Таким образом, можно заключить, что PRC2 играет важнейшую роль в регуляции развития млекопитающих и дифференцировки ЭСК, однако, этот комплекс не влияет на процесс получения ЭСК и их самообновление. На сегодняшний момент получены многочисленные экспериментальные доказательства совместной регуляции генов-мишеней комплексом PRC2 и транскрипционными факторами OCT4, SOX2

и NANOG, находящимися в центре системы регуляции транскрипции генов в ЭСК мыши и человека. Исследования, проводимые в масштабе целых геномов, показали, что OCT4, SOX2, NANOG и субъединицы PRC2 солокализуются в пределах генов, ответственных за развитие, внутриклеточную передачу сигналов, морфогенез и органогенез, а следовательно, могут действовать совместно [8, 28, 71, 72].

### КОМПЛЕКС TRITHORAX (TRXG)

Белки комплекса Trithorax – одни из основных регуляторов эмбрионального развития как беспозвоночных, так и позвоночных животных [73]. В развитии комплекс Trithorax действует противоположно белкам группы Polycomb, устанавливая модификацию H3K4me3, которая, в основном, ассоциирована с активацией транскрипции. В отличие от комплексов PRC1 и PRC2, роль белков Trithorax в поддержании плюрипотентности клеток изучена слабо [74]. Как и у беспозвоночных животных, у млекопитающих Trithorax представляет собой мультисубъединичный комплекс, содержащий гистон-метилтрансферазы SET/MLL. Ферментам SET/MLL для активации необходимы основные субъединицы комплекса – WDR5, ASH2L и RBBP5 [75]. При этом известно, что гетеродимер ASH2L и RBBP5 непосредственно участвуют в гистон-метилтрансферазной активности комплекса MLL1 [76]. Кроме того, существуют экспериментальные доказательства того, что белок ASH2L необходим для нормального эмбриогенеза и инактивации X-хромосомы у самок мыши [77]. Субъединица WDR5 также является основным компонентом комплекса Trithorax млекопитающих. Ее функция заключается в «представлении» остатков H3K4, а также в осуществлении эффективного взаимодействия всего комплекса Trithorax с H3K4 и реализации его гистон-метилтрансферазной активности [75]. Кроме того, известно, что WDR5 опознает H3K4me2 и опосредует переход H3K4 в триметилированное состояние (H3K4me3) [78]. Недавно было обнаружено, что WDR5 необходим не только для нормального развития позвоночных, но и играет важнейшую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК и репрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию [74]. Установлено, что подавление экспрессии WDR5 резко снижает самообновление ЭСК мыши. Протеомные исследования позволили установить, что WDR5 физически взаимодействует с транскрипционным фактором OCT4 в недифференцированных ЭСК, и мишени этих двух белков в значительной степени перекрываются. Таким образом показано, что комплекс Trithorax вместе с факторами OCT4, SOX2 и NANOG позитивно регулирует транскрипцию генов в ЭСК мыши. Более того, в экспериментах по репрограммированию соматических клеток показано, что комплекс Trithorax

(WDR5) необходим для эффективного образования клонов ИПСК [74].

### КОМПЛЕКС VAF

Многочисленные исследования показывают, что АТФ-зависимые белковые комплексы, ремоделирующие хроматин, играют важнейшую роль в эмбриональном развитии млекопитающих в целом и в поддержании плюрипотентности клеток в частности [79–84]. У млекопитающих известно около 30 белков, обладающих АТФ-зависимой хроматин-ремоделирующей активностью. Эти белки объединены в несколько семейств в соответствии со структурой АТФ-азного домена. В клетках млекопитающих ремоделирующие хроматин АТФ-азы взаимодействуют друг с другом и с другими белками и действуют в составе белковых комплексов, состоящих из нескольких субъединиц. Примерами таких комплексов могут служить VAF, NuRD, ISWI. Белковый комплекс VAF участвует в перераспределении нуклеосом хроматина, он присутствует во всех типах клеток. Однако субъединичный состав этого комплекса может различаться в клетках разного типа, за счет чего осуществляется специфичный для каждого типа клеток контроль структуры хроматина. ЭСК содержат комплекс VAF, названный esVAF, который, в свою очередь, состоит из специфичного набора субъединиц BRG, VAF155 и VAF60a, но не содержит субъединицы BRM, VAF170 или VAF60c [83, 84]. Экспериментально показано, что инактивация большинства субъединиц комплекса VAF вызывает гибель эмбрионов мыши на ранних стадиях развития, а также приводит к онкотрансформации клеток [79, 85–88]. Кроме того, в случае потери субъединиц BRG, VAF47 и VAF155, гибель эмбрионов обусловлена нарушением формирования плюрипотентных клеток. Масштабный скрининг библиотек интерферирующих РНК также показал, что такие субъединицы, как BRG и VAF155, необходимы для поддержания морфологии колоний ЭСК и экспрессии гена *Nanog* [89, 90]. Согласно протеомным данным несколько субъединиц, хроматин-ремоделирующих комплексов физически взаимодействуют с белками OCT4 и NANOG в ЭСК [35–38, 83, 84].

Транскрипционные факторы OCT4 и NANOG могут взаимодействовать с комплексами, ремоделирующими структуру хроматина, посредством специфических белков [37, 90]. Например, показано, что белок скаффолда хромосом TIF1b (Transcription Intermediary Factor-1b) необходим для поддержания активности трансгена *GFP* под контролем промотора *Oct4* в ЭСК [92]. Интересно, что ранее TIF1b был известен как белок, участвующий в транскрипционном сайленсинге и формировании гетерохроматина

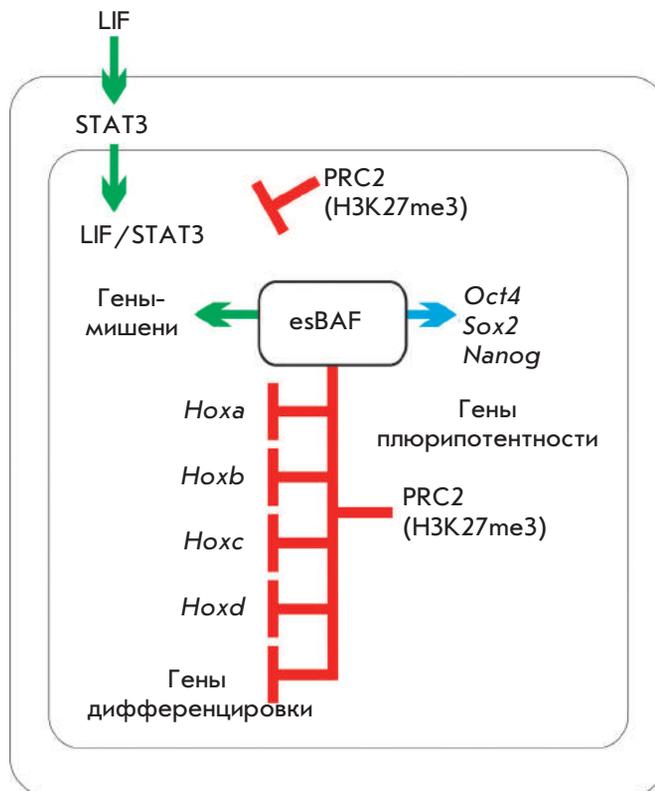
через привлечение гетерохроматинового белка HP1, гистон-метилтрансферазы SETDB1 и NuRD. Однако фосфорилированная форма TIF1b может взаимодействовать с ЭСК-специфичной формой комплекса BAF, локализуется в эухроматине и способна влиять на эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [91]. Кроме того, сверхэкспрессия ЭСК-специфичных компонентов этого комплекса – BRG1 и BAF155 – повышает эффективность репрограммирования соматических клеток в отсутствие сверхэкспрессии гена *c-Myc* [93, 94].

Недавно было показано, что комплекс esBAF связан непосредственно с работой сигнального каскада LIF-STAT3, необходимого для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [95, 96]. Транскрипционный фактор STAT3 активирует, как известно, группы генов в разных типах клеток, содержащих специфические комплексы BAF, но только в ЭСК он участвует в регуляции набора генов-мишеней, необходимых для сохранения недифференцированного статуса ЭСК. Однако долгое время оставалось неизвестным, каким образом осуществляется такое специфическое действие STAT3.

В работе Л. Хо и соавт. [96] установлено, что в геноме ЭСК мыши связывание STAT3 с сайтами-мишенями зависит от BRG1, АТФ-азной субъединицы ЭСК-специфичного комплекса esBAF. Действие BRG1 в пределах сайтов связывания STAT3 создает структуру хроматина, строго необходимую для активации генов интерлейкином LIF. Делеция BRG1 вызывает опосредованный PRC2 транскрипционный сайленсинг множества генов в масштабе всего генома, посредством модификаций гистона H3K27me3. Транскрипционному сайленсингу подвергаются и гены-мишени STAT3. На основании этих фактов сделан вывод, что основная роль BRG1 в ЭСК мыши заключается в усилении действия сигнального каскада LIF-STAT3 и противодействии репрессии данного каскада белком Polycomb (PRC2). Интересно, что BRG1 может действовать совместно с Polycomb, усиливая репрессию генов дифференцировки, например генов семейства HOX. Таким образом, комплекс esBAF действует как антагонистично, так и синергично с PRC2, однако, оба типа действия направлены на поддержание плюрипотентности [96] (рис. 3).

### КОМПЛЕКС NuRD

Белковый комплекс NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) млекопитающих, который проявляет АТФ-зависимую ремоделирующую и гистон-деацетилазную активность), состоит минимум из шести субъединиц [97, 98]. NuRD содержит гистон-деацетилазы HDAC1 и HDAC2, активность которых



**Рис. 3.** Схема совместного действия esBAF и PRC2 при поддержании плюрипотентности. esBAF и PRC2 могут действовать как синергично, так и антагонистично. Комплекс esBAF действует антагонистично по отношению к PRC2 при регуляции генов-мишеней сигнального каскада LIF-STAT3, подготавливая структуру хроматина для активации фосфорилированной формой STAT3 (зеленая стрелка). В то же время esBAF действует совместно с PRC2, репрессируя транскрипцию генов семейства HOX (красные линии с тупыми концами). Однако уровень экспрессии генов плюрипотентности может активироваться или репрессироваться esBAF (синяя стрелка) [96]

зависит от хромодоменсодержащих АТФ-азных субъединиц Mi2a и Mi2b. Кроме того, в состав комплекса входят белки, связывающие метилированный цитозин MBD 1, 2 и 3 (Methyl-CpG-binding protein), белки MTA1, 2 и 3 (Metastasis-associated protein), WD40-содержащие белки RbAP46 и RbAP48, а также два белка, содержащих домены типа цинковый палец – r66a и r66b. Показано, что несколько субъединиц комплекса NuRD важны для поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК. Эмбриональные стволовые клетки с делетированным геном, кодирующим MBD3, сохраняют жизнеспособность и экспрессию маркеров плюрипотентности, однако при этом нарушается их способность к дифферен-

цировке как *in vitro*, так и *in vivo* при формировании химерных животных [99]. Однако в одной из более поздних работ было показано, что нокаут *Mbd3* в ЭСК мыши вызывает повышение уровня транскрипции таких маркеров трофобласта, как гены, *Cdx2*, *Eomesodermin* и *Hand1*, и повышение уровня ацетилирования гистона H3 в промоторных областях этих генов. Более того, нокаутные клетки, культивируемые в среде для трофобластных стволовых клеток, дифференцировались в клетки трофобласта, экспрессирующие CDX2 и CADHERIN 3 [100]. В опытах *in vivo* показано, что MBD3 необходим для развития эпибласта из клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) после имплантации. В эмбрионах с дефицитом MBD3 гены плюрипотентности *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* и их гены-мишени экспрессируются на нормальном уровне, однако отмечается нарушение нормального сайленсинга их транскрипции после имплантации. Культивируемые ВКМ MBD3-дефицитных эмбрионов, напротив, практически неспособны формировать линии плюрипотентных ЭСК, хотя формируют значительное количество энтодермальных производных [101].

В ЭСК мыши существует специфическое подсемейство комплексов NuRD, названное NODE (NANOG and OCT4 associated Deacetylase). В состав комплекса NODE входят гистон-деацетилазы HDAC1 и HDAC2, а также белки MTA1 и 2, однако этот комплекс практически не содержит (выявляются в субстехиометрических количествах) субъединицы MBD3 и RBBP7. NODE интересен тем, что в ЭСК мыши он физически взаимодействует с транскрипционными факторами OCT4 и NANOG [35]. Комплекс NODE обладает деацетилазной активностью, которая не зависит от MBD3. Нокаут генов, кодирующих субъединицы NODE, вызывает повышение экспрессии генов, ответственных за дифференцировку и, как следствие, приводит к дифференцировке ЭСК в различные клеточные производные. В опытах по подавлению трансляции показано, что, в отличие от MBD3, необходимого для подавления транскрипции генов, поддерживающих недифференцированное состояние клетки, MTA1 вовлечен в подавление генов дифференцировки, например, таких, как *Gata6* и *FoxA2* [35]. Таким образом, в ЭСК представлены как минимум два подсемейства комплексов NuRD, действующих разнонаправленно: MBD3-содержащие комплексы, регулирующие (подавляющие) транскрипцию генов плюрипотентности (*Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, и др.) и необходимые для дифференцировки ЭСК в различные клеточные производные, для дифференцировки клеток в раннем эмбриональном развитии, а также HDAC1, HDAC2 и MTA1-содержащие комплексы, взаимодействующие с белками OCT4 и NANOG

и участвующие в активации транскрипции генов, отвечающих за поддержание недифференцированного состояния клеток.

Недавно установили, что MBD3-содержащий комплекс NuRD необходим для модификации H3K27me3 комплексом PRC2 в пределах промоторов генов, вовлеченных в процессы развития и дифференцировки. Таким образом, NuRD не просто выполняет функцию репрессора транскрипции генов, но и отвечает за установление баланса между ацетилированием и метилированием H3K27 в эмбриональных стволовых клетках [102]. Однако это не единственный пример взаимодействия хроматинре моделирующих комплексов в ЭСК. Комплекс NuRD, а именно его субъединица MBD3, тесно взаимодействует с esBAF (BRG1) в ЭСК мыши [103]. Субъединицы MBD3 и BRG1 солокализуются в пределах точек старта транскрипции и разнонаправленно регулируют транскрипцию обширного набора генов. Более того, MBD3 и BRG1 играют важную роль в регуляции транскрипции через гидроксиметилирование остатков цитозина. Субъединица MBD3 локализуется вместе с белком TET1 и 5-гидроксиметилцитозинами (5hmC) *in vivo*, при этом связывание MBD3 с промоторами зависит от TET1. Эксперименты, проведенные *in vitro*, показали, что MBD3 эффективнее связывается с 5-гидроксиметилцитозинами, чем с 5-метилцитозинами, при этом нокаут гена *Mbd3* влияет преимущественно на транскрипцию генов, маркированных 5hmC, а MBD3 и BRG1 необходимы для поддержания уровня 5-гидроксиметилирования [103].

Ранее считалось, что 5-гидроксиметилирование ДНК – это всего лишь промежуточное состояние в процессе деметилирования 5-метилцитозина [104]. Однако оказалось, что нокаут генов из семейства *Tet*, которые кодируют белки, осуществляющие гидроксильное 5-метилцитозина, вызывает нарушение дифференцировки (*Tet1*, *Tet2*) и самообновления (*Tet1*) ЭСК [105–107]. Кроме того, состояние 5-гидроксиметилирования ДНК может занимать продолжительное время в процессе раннего эмбрионального развития и, возможно, выполнять регуляторные функции [108, 109]. Все представленные факты говорят о том, что 5-гидроксиметилирование может быть самостоятельным регуляторным состоянием эпигенома, а комплексы NuRD и esBAF играют важнейшую роль в реализации его регуляторного потенциала. В то же время само 5-гидроксиметилирование ДНК непосредственно влияет на совместное регуляторное действие NuRD и esBAF.

#### КОМПЛЕКС Tip60-p400

Комплекс Tip60-p400 обладает гистон-ацетилазной, а также ремоделирующей актив-

ностью, он может действовать и как активатор, и как репрессор транскрипции [110, 111]. Кроме того, Tір60-р400 участвует в замене форм гистонов H2AZ-H2B [112, 113]. Эмбрионы с нокаутом генов *Tір60* и *Trrap*, кодирующих субъединицы Tір60-р400, гибнут на предимплантационной стадии [114, 115]. Подавление трансляции нескольких субъединиц Tір60-р400 в ЭСК при помощи РНК-интерференции показало, что комплекс Tір60-р400 важен для нормального самообновления и дифференцировки клеток. Эксперименты по иммунопреципитации хроматина показали, что р400 солокализует с белком NANOG и H3K4me3, меткой активного хроматина, в недифференцированных ЭСК мыши. Спектры генов-мишеней NANOG и Tір60-р400 в значительной степени перекрываются. Более того, NANOG и H3K4me3 необходимы для связывания Tір60-р400 с генами-мишенями. Tір60-р400, в свою очередь, осуществляет ацетилирование гистона H4 [89].

**ПРЯМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ МОДУЛИРУЮТ СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА, ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ, ВОВЛЕЧЕННЫМИ В ОСНОВНЫЕ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ**

Помимо взаимодействия с белковыми комплексами, транскрипционные факторы, входящие в систему поддержания плюрипотентности, могут прямо регулировать гены хроматинмодифицирующих ферментов. В ЭСК фактор транскрипции OCT4 активирует гены деметилаз JMJD1A/KDM2A и JMJD2C/KDM4B, которые деметилируют H3K9me2 и H3K9me3 соответственно, а KDM2A и KDM4B, в свою очередь, осуществляют деметилирование промоторной области генов *Tcl1* и *Nanog* соответственно [116].

Транскрипционные факторы, регулирующие плюрипотентность, взаимодействуют с промоторами генов, продукты которых участвуют в глобальной регуляции структуры хроматина. Например, такие факторы, как OCT4, SOX2, NANOG, SMAD1, ZFX и E2F1, связаны с промотором гена *Chd1* [117]. Этот ген кодирует фермент, участвующий в ремоделировании хроматина. При помощи двух хромодоменов CHD1 связывается с гистонами H3, ди- и триметилированным в положении K4, который служит меткой активного хроматина и транскрибируемых генов [118]. Подавление экспрессии *Chd1* в ЭСК мыши не влияет на самообновление ЭСК, но смещает их дифференцировку в нейрональное направление [119].

В формировании глобальной структуры хроматина может принимать участие фактор UTF1 (Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1), который транскрибируется на высоком уровне в не-

дифференцированных ЭСК мыши. Этот белок связан с хроматином, он локализуется в регуляторных областях более 1700 генов, значительная часть из которых перекрывается с ранее идентифицированными генами-мишенями транскрипционных факторов NANOG, OCT4, KLF4, C-MYC и REX1. Снижение синтеза UTF1 приводит к повышению уровня экспрессии большинства регулируемых им генов и нарушению дифференцировки ЭСК. Это говорит о том, что UTF1 в основном является репрессором транскрипции генов, вовлеченных в дифференцировку клеток [120]. Ранее показали, что энхансерный элемент, расположенный в 3'-нетранслируемой области гена *Utf1*, селективно связывается с транскрипционными факторами OCT4 и SOX2 [121].

Таким образом, в ЭСК обнаружены такие регуляторы структуры хроматина, как CHD1 и UTF1, экспрессия генов которых прямо регулируется транскрипционными факторами, которые входят в основную внутреннюю систему поддержания плюрипотентности клеток.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ**

Метилирование ДНК, наряду с ковалентными модификациями гистонов, является основным механизмом регуляции клеточных процессов у млекопитающих [122]. На сегодняшний день известно, что метилирование ДНК участвует в таких фундаментальных явлениях и процессах, как эмбриогенез, дифференцировка клеток, геномный импринтинг, канцерогенез, регуляция транскрипции мобильных элементов генома, инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих [123–128].

Безусловно, метилирование ДНК играет важнейшую роль в регуляции самообновления и плюрипотентности клеток [129]. Промоторы основных генов, связанных с поддержанием плюрипотентности и самообновлением ЭСК (*Oct4* и *Nanog*), гипометилированы в недифференцированных клетках и гиперметилированы в стволовых и соматических клетках трофобласта [130, 131]. При дифференцировке клеток в культуре или во время эмбрионального развития промоторы генов, поддерживающих самообновление, подвергаются метилированию, в котором участвуют ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B [132]. Нокаут генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, вызывает нарушение эмбрионального развития и дифференцировки ЭСК *in vitro* [132–135]. Однако ЭСК мыши с одновременным нокаутом генов *Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b* сохраняют способность к самообновлению [136]. Метилирование ДНК, осуществляемое DNMT3A и DNMT3B, участвует в надежной репрессии генов плюрипотентности в эмбриональном

развитии. Показано, что гистон-метилтрансфераза G9a, устанавливающая модификацию H3K9me3 в районе промотора гена *Oct4*, привлекает в данную область гетерохроматиновый белок HP1 и ДНК-метилтрансферазы [137].

В геномах млекопитающих метилированию подвергаются остатки цитозина в составе CpG-динуклеотидов [138]. В плюрипотентных клетках снижен уровень метилирования CpG-богатых промоторов (содержащих так называемые CpG-островки), часто ассоциированных с генами «домашнего хозяйства», и повышен уровень метилирования промоторов с низким уровнем CpG [129, 139]. Большинство таких «обедненных» промоторов содержат метку активного хроматина – H3K4me3. По всей видимости, установление H3K4me3 осуществляется в результате связывания неметилированных CpG-островков с белком CPF1, ассоциированным с гистон-метилтрансферазой SETD1 [140]. Метилирование H3K4, в свою очередь, может «защищать» промоторы генов от действия ДНК-метилтрансфераз [141].

За последние годы показано, что в геномах ЭСК и ИПСК значительная часть (до 25% в ЭСК человека) метилированных остатков цитозина находится вне CpG [142–144], причем не-CpG-метилирование наблюдается в основном в экзонах, а не в регуляторных областях генов [143, 144]. Паттерн распределения не-CpG-метилирования в различных линиях плюрипотентных клеток очень вариабелен, а в некоторых дифференцированных клетках он практически отсутствует. Кроме того, нокаут генов *DNMT3A* и *DNMT3B* в ЭСК человека резко снижает уровень не-CpG-метилирования [145].

Многие экспериментальные данные говорят о том, что репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию (получение ИПСК) сопровождается глобальным изменением метилома в сторону состояния, характерного для плюрипотентных клеток [144, 146, 147]. Деметилированию подвергаются промоторы генов, участвующих в поддержании самообновления, например генов *Oct4* и *Nanog* [11, 12, 148]. В репрограммировании могут участвовать такие ДНК-деметилазы, как TET1 и AID. Деметилаза TET1, катализирующая превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, важна для поддержания самообновления ЭСК мыши, она регулирует метилирование ДНК в промоторе гена *Nanog* [106]. Кроме того, на модели репрограммирования с использованием гибридных клеток между ЭСК мыши и фибробластами человека показано, что деметилаза AID необходима для деметилирования промоторов генов *OCT4* и *NANOG* человека [149]. Важность деметилирования для осуществления репрограммирования клеток подтверждается еще и тем, что применение

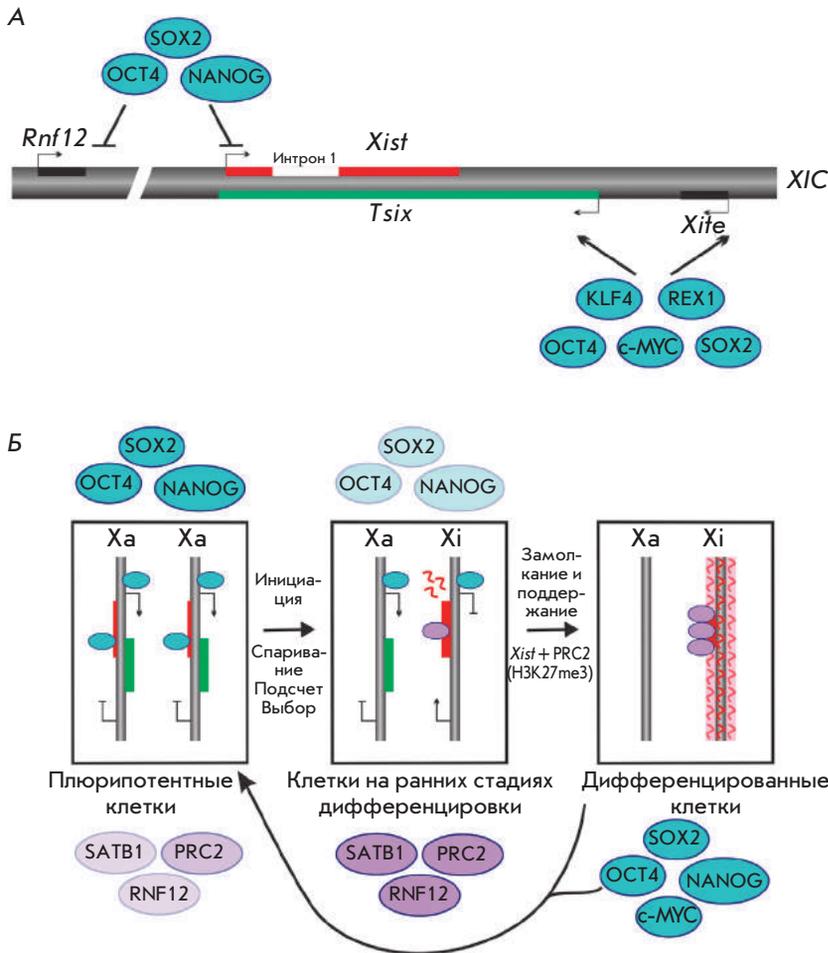
ингибиторов ДНК-метилтрансфераз позволяет повысить эффективность получения ИПСК [146, 150].

### ФАКТОРЫ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ

Инактивация X-хромосомы – сложный процесс, события которого происходят в раннем эмбриогенезе млекопитающих. У мыши уже во время первых делений дробления зиготы происходит импринтированная инактивация X-хромосомы, унаследованной от самца. При формировании бластоцисты X-хромосома реактивируется в клетках внутренней клеточной массы. Во время гастрюляции и дифференцировки клеток ВКМ происходит случайная инактивация одной из двух хромосом [151–153]. Процесс инактивации контролируется определенным локусом, расположенным на X-хромосоме, названным центром инактивации [154]. В данный локус входят несколько генов, однако основными регуляторами считают гены *Xist* и *Tsix*, которые транскрибируются антипараллельно и кодируют нетранслируемые ядерные РНК [155, 156]. Показано, что РНК *Xist* транскрибируется моноаллельно с неактивной X-хромосомы, покрывает неактивную хромосому и способствует появлению модификаций, соответствующих неактивному хроматину [155]. Ген *Tsix*, напротив, является негативным регулятором гена *Xist*, он транскрибируется с активной хромосомы [157]. Так как события инактивации происходят в раннем эмбриогенезе, изучение их динамики и молекулярных основ представляет сложную задачу, практически невыполнимую в случае такого объекта, как человек. Вследствие этого, в настоящее время наиболее подходящими и часто используемыми моделями для изучения инактивации X-хромосомы стали линии плюрипотентных клеток, которые получают из предимплантационных эмбрионов (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК) или в результате репрограммирования соматических клеток (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК) мыши и человека. Однако изучение статуса X-хромосомы и молекулярно-генетические исследования регуляции процесса X-инактивации выявили ряд различий между мышью и человеком.

Эмбриональные стволовые клетки самок мыши, получаемые из предимплантационных бластоцист (3.5 дня после оплодотворения), сохраняют многие свойства клеток ВКМ, в частности, они способны поддерживать в ряду митотических делений обе активные X-хромосомы [152]. При дифференцировке ЭСК мыши происходит случайная инактивация одной из двух хромосом. Это свойство ЭСК мыши воспроизводимо и стабильно [152, 153].

В случае ЭСК человека, которые тоже получают из бластоцист (5–9 дней после оплодотворения), дело



**Рис. 4.** Транскрипционные факторы плюрипотентности в регуляции процесса инактивации X-хромосомы (*Xic*). **А** – Схема центра инактивации X-хромосомы мыши. Красным выделен ген *Xist*, зеленым – *Tsix*, черным – активаторы данных генов – *Rnf12* и *Xite* соответственно. В недифференцированных ЭСК самок мыши транскрипционные факторы OCT4, SOX2 и NANOG связываются с первым интроном *Xist* и *Rnf12*, подавляя их транскрипцию. В то же время белки OCT4, SOX2, KLF4, REX1 и c-MYC связываются с регуляторными областями *Tsix* и *Xite*, активируя их транскрипцию. **Б** – В ЭСК самок мыши происходит активация гена *Tsix* и подавление *Xist* белками, участвующими в поддержании плюрипотентности. Во время дифференцировки происходит инактивация одной из X-хромосом. Инактивация – многостадийный процесс, включающий инициацию инактивации, установление и поддержание транскрипционного сайленсинга. Инициация инактивации связана со снижением экспрессии факторов плюрипотентности и включением в процесс инактивации регуляторов структуры хроматина, например SATB1 и PRC2. Сверхэкспрессия таких факторов, как OCT4, SOX2, NANOG и c-MYC, в соматических клетках вызывает репрограммирование к плюрипотентному состоянию, которое сопровождается реактивацией неактивной X-хромосомы [166]

обстоит несколько сложнее [4]. Масштабный анализ множества линий ЭСК человека показал, что их можно разделить на три класса [158]. К первому классу относятся ЭСК с двумя активными X-хромосомами, которые подвергаются случайной инактивации в процессе дифференцировки, данный класс соответствует ЭСК мыши. Во второй класс входят линии ЭСК, в которых неактивной является одна из хромосом, и транскрибируется ген *XIST*, при этом клетки сохраняют все признаки плюрипотентности. К третьему классу относятся линии, в которых неактивна одна из X-хромосом, однако ген *XIST* не транскрибируется, даже при дифференцировке клеток. Неактивные X-хромосомы в линиях второго класса несут метки неактивного хроматина, такие, как H3K27me3, H4K20me и вариант гистона macroH2A. Интересно, что линии третьего класса практически лишены меток неактивного хроматина. В то же время молекулярно-генетический анализ выявляет при-

знаки подавления транскрипции большинства генов неактивных хромосом [158].

Отсутствие связи между плюрипотентностью и эпигенетическим статусом X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека показано и на примере ИПСК. ИПСК мыши, как и ЭСК, имеют две активные X-хромосомы (в клетках, полученных от самок), одна из которых подвергается случайной инактивации при запуске дифференцировки [159]. Однако у человека ИПСК могут иметь все характерные черты плюрипотентных клеток и содержать при этом одну неактивную X-хромосому, т.е. соответствовать второму классу ЭСК [160]. Статус X-хромосом может меняться в процессе репрограммирования, в результате чего возможно появление субклонов, соответствующих первому и третьему классам ЭСК. Отмечено, что реактивация неактивной X-хромосомы может происходить при репрограммировании соматических клеток человека [147]. По всей

видимости, меняя условия культивирования клеток, можно добиться получения клонов ЭСК и ИПСК, несущих активные хромосомы. Например, недавно показали, что культивирование клеток в условиях физиологической концентрации кислорода (5%) может значительно усилить эффективность получения ЭСК человека первого класса. Различные физиологические стрессы могут, напротив, вызывать переход клеток во второй и третий классы, согласно статусу X-хромосом [161]. Кроме того, сверхэкспрессия *KLF4* в присутствии набора ингибиторов сигнальных путей в ЭСК и ИПСК человека также может приводить к реактивации неактивной X-хромосомы [162]. Это говорит о нестабильности статуса X-хромосом в плюрипотентных клетках человека.

Несмотря на то что связь между состоянием плюрипотентности клеток мыши и статусом X-хромосом в эмбриогенезе и культуре достаточно очевидна, до недавнего времени не существовало прямых доказательств связи данных феноменов на молекулярном уровне. Однако выявлена связь между транскрипционными факторами и регуляцией генов *Xist* и *Tsix*. Например, транскрипционные факторы NANOG, OCT4 и SOX2 имеют потенциальные сайты связывания в первом интроне гена *Xist* и связаны с ним в недифференцированных ЭСК мыши [163] (рис. 4). Нокаут генов *Oct4* и *Nanog* вызывает активацию транскрипции *Xist*. Таким образом, факторы плюрипотентности могут подавлять экспрессию гена *Xist* по *Tsix*-независимому механизму [163]. Позже было установлено, что факторы NANOG, OCT4 и SOX2 могут подавлять транскрипцию *Xist*, репрессируя экспрессию его активатора – *Rnf12*. При этом удаление первого *Xist* не вызывает инактивации X-хромосомы [164, 165] (рис. 4).

Факторы, связанные с поддержанием плюрипотентности и репрессии *Xist*, могут участвовать в активации транскрипции гена *Tsix* [167] (рис. 4). Так, связывание факторов OCT4, SOX2 и KLF4 обнаружено в районе энхансера *Xite*, хотя это взаимодействие не подтверждено в других работах [168]. Сайты связывания REX1, c-MYC и KLF4 найдены в регуляторном элементе *DXPas34*. Установлено, что REX1 в большей степени необходим для элонгации РНК *Tsix*, чем для сборки транскрипционного комплекса. Таким образом, все перечисленные выше исследования подтверждают связь системы поддержания плюрипотентности и активного статуса обеих X-хромосом в недифференцированных ЭСК мыши. Подобные закономерности не действуют в ЭСК человека. Трансгены *XIST* человека продолжают быть активными в ЭСК мыши, несмотря на присутствие факторов, поддерживающих плюрипотентность. По всей видимости, в регуляцию генов *XIST* и *TSIX*

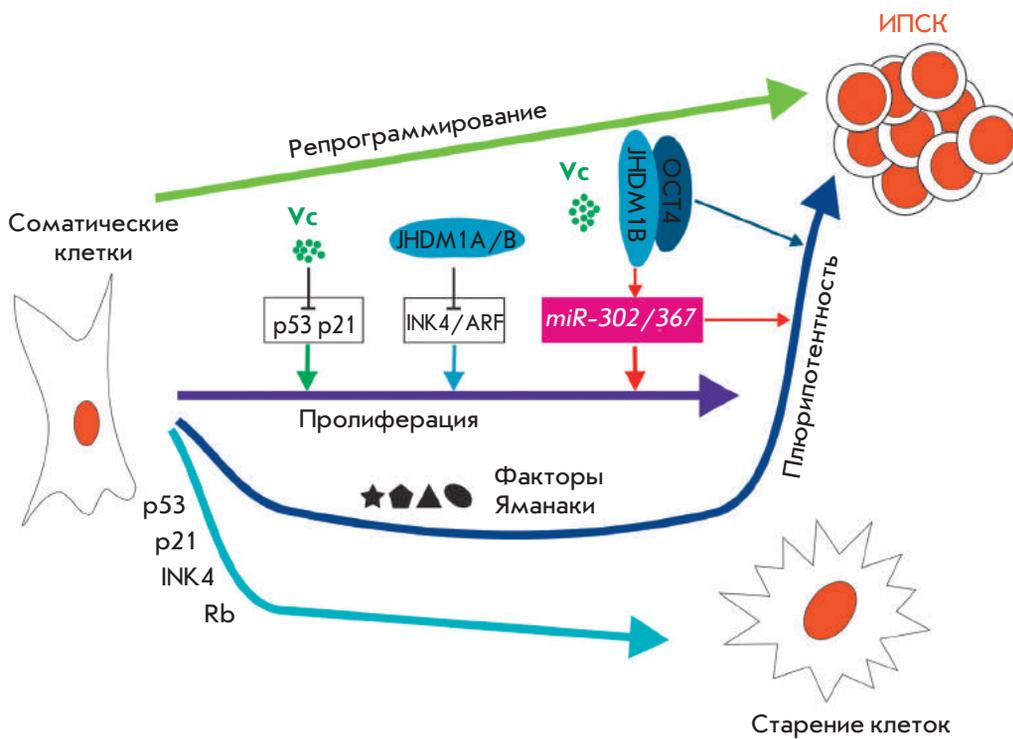
человека вовлечены иные механизмы, например метилирование ДНК. В ЭСК мыши промотор *Xist* метилирован лишь частично, даже на активной хромосоме, и транскрипция гена репрессируется, видимо, транскрипционными факторами. В ЭСК человека первого типа промотор *XIST* метилирован практически полностью (на 100%). Кроме этого, различия могут объясняться тем, что ЭСК человека по своим свойствам (паттерн экспрессии генов, чувствительность к сигнальным молекулам) сходны со стволовыми клетками эпибласта мыши, в которых инактивирована одна из X-хромосом, несмотря на экспрессию факторов плюрипотентности [169].

По всей видимости, изучение статуса X-хромосом в ИПСК человека должно войти в стандартный набор тестов вновь получаемых линий, наряду с анализом экспрессии маркеров плюрипотентности, определением паттерна транскрипции генов и дифференцировки. Выбирая клоны клеток с инактивированной отцовской или материнской хромосомой, можно избирательно получать линии с неактивными мутантными аллелями, а следовательно, клетки, которые можно применять в терапии заболеваний, сцепленных с X-хромосомой.

#### **ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ КЛЕТОК К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ. «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ»**

Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию сопровождается глобальным изменением их эпигеномов [146, 159, 170]. В настоящее время для повышения эффективности получения ИПСК человека и мыши применяют ряд химических ингибиторов ферментов, вовлеченных в формирование структуры хроматина. В частности, применение ингибитора гистон-метилтрансферазы G9a (VIX-01294), ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (5'-азацитидин, RG108) и гистон-деацетилаз (вальпроевая кислота, TSA, SANA, бутират натрия) позволяет увеличить эффективность репрограммирования в десятки раз [18, 20, 150, 171–173]. Более того, недавно был выяснен механизм влияния аскорбиновой кислоты (витамина С) на эффективность получения ИПСК [174].

Ранее было известно, что аскорбиновая кислота может существенно повышать (от 3.8 до 8.75%) эффективность репрограммирования фибробластов и стволовых клеток жировой ткани, однако механизм ее действия оставался неизвестным [175]. Оказалось, что основным эффектором аскорбиновой кислоты являются гистон-деметиلاзы JHDM1A и 1B. Аскорбиновая кислота вызывает опосредованное JHDM1A/1B деметилирование гистона H3 в поло-



**Рис. 5.** Схема совместного действия аскорбиновой кислоты (витамина С) и JHDM1A/1B на репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию. Витамин С и JHDM1A/1B противостоят старению клеток путем подавления действия белков p53/p21 и INK4/ARF. Кроме того, аскорбиновая кислота и комплекс JHDM1B с OCT4 активирует экспрессию кластера микроРНК 302/367, что также усиливает эффективность репрограммирования [174]

жении K36 (H3K36me2/3) в культуре эмбриональных фибробластов мыши, а также в процессе репрограммирования (рис. 5). Доказано, что JHDM1A/1B необходимы для репрограммирования, участвуют в ускорении клеточного цикла и подавлении старения клеток путем репрессии локуса *Ink4/Arf* (рис. 5). Известно, что высокий темп деления клеток и подавление механизмов старения и апоптоза необходимы для полного и эффективного репрограммирования соматических клеток [176–180]. Более того, JHDM1A/1B вместе с транскрипционным фактором OCT4 участвуют в активации экспрессии кластера микроРНК 302/367, также вовлеченного в репрограммирование клеток [14, 15, 174] (рис. 5).

Т. Ондер и соавт. [181] провели скрининг набора интерферирующих РНК, направленных на подавление трансляции 22 генов, продукты которых участвуют в метилировании ДНК и гистонов. Оказалось, что подавление трансляции мРНК генов, кодирующих компоненты комплексов PRC1 (BMI1, RING1) и PRC2 (EZH2, EED, SUZ12), существенно снижает эффективность репрограммирования фибробластов человека. Снижение эффективности наблюдалось и при подавлении *EHMT1* и *SETDB1*, кодирующих H3K9 гистон-метилтрансферазы. Среди генов, подавление трансляции мРНК которых, напротив, существенно повышало эффективность репрограммирования, были *YY1*, *SUV39H1* и *DOT1L*. Ген *YY1* кодирует белок, способный, в зависимости от контекста, действо-

вать и как активатор, и как репрессор транскрипции. *SUV39H1* кодирует H3K9 гистон-метилтрансферазу, а *DOT1L* – H3K79 гистон-метилтрансферазу. Основное внимание исследователей было уделено *DOT1L*. Оказалось, что подавление экспрессии *DOT1L* при помощи РНК-интерференции или химическое ингибирование *DOT1L* может заменить функции генов *KLF4* и *c-MYC* в опытах по получению ИПСК из фибробластов человека. Кроме того, ингибирование *DOT1L* на ранних стадиях репрограммирования приводит к активации генов *NANOG* и *LIN28*, которые используются также в случае клеток человека. Анализ распределения H3K79me2 в масштабе всего генома показал, что ассоциированные с эпителиально-мезенхимальным переходом гены, экспрессия которых специфична для фибробластов, теряют данную модификацию гистона на ранних стадиях репрограммирования. Ингибирование *DOT1L* ускоряет «стирание» H3K79me2 в пределах генов, которые подвергаются транскрипционному сайленсингу в ИПСК [181].

Все эти факты говорят о важнейшей роли системы эпигенетических регуляторов в процессе репрограммирования.

При помощи высокопроизводительных методов анализа выявлена высокая степень сходства ИПСК и ЭСК по паттерну экспрессии генов и состоянию эпигеномов как на уровне метилирования ДНК, так и на уровне распределения ковалентных модификаций гистонов H3K27me3 и H3K4me3 [147, 182].

Несмотря на значительное сходство ИПСК и ЭСК на молекулярном уровне, ряд исследований показал, что транскриптомы и эпигеномы отдельных линий ИПСК могут обладать некоторыми характерными особенностями, а также сохранять ряд черт, свойственных исходным соматическим клеткам [183–186]. Эффект сохранения некоторых черт эпигеномов соматических предшественников называют «эпигенетической памятью» [187, 188].

Современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют изучать метилирование ДНК и распределение ковалентных модификаций гистонов в масштабе всего генома с очень большим разрешением. В качестве примера можно привести работу Р. Листера и соавт. [144], в которой применен метод MethilC-Seq. Этот метод позволяет изучать метилирование остатков цитозина на уровне всего генома с разрешением в один нуклеотид. Авторы постарались избежать возможного влияния способа получения ИПСК и типа соматических клеток на получаемые результаты. В этой работе использовали пять линий ИПСК: одну линию, полученную с помощью ретровирусной трансдукции стволовых клеток жировой ткани генами *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *c-MYC*; вторую линию, полученную при помощи лентивирусной трансдукции фибробластов легкого IMR90 генами *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28*; три линии, полученные с использованием неинтегрирующихся эписомных векторов из фибробластов крайней плоти. Кроме того, в исследование были включены две линии ЭСК, а также трофобластные производные ИПСК и ЭСК, дифференцированные с применением BMP4. В результате определили статус метилирования 75.7–94.5% всех остатков цитозина в геномах 11 линий клеток. Интересно, что авторы сфокусировали свое внимание не только на метилировании цитозинов в составе CpG-динуклеотидов, но и на не-CpG-метилировании (CpH, где H = A, C или T). Показано, что в масштабе геномов ИПСК и ЭСК человека имеют сходный паттерн метилирования. Геномы плюрипотентных клеток в среднем более метилированы, чем геномы соматических клеток. Выявлены серьезные отличия на уровне CpH-метилирования ДНК. Соматические клетки, включая стволовые клетки жировой ткани, характеризуются крайне низким уровнем такого типа метилирования, в то время как в ИПСК и ЭСК доля метилированных цитозинов в составе CpH-динуклеотидов ДНК составляет 20–30% от всех метилированных остатков цитозина в геноме. Более того, и в ЭСК, и в ИПСК наблюдается обогащение ДНК экзонов и интронов метилированными CpH.

Интересно, что несмотря на общее сходство метиломов ЭСК и ИПСК, выявлен ряд отличий между ними, в том числе 1175 дифференциально метилиро-

ванных областей (ДМО), длина которых варьирует от 1 до 11 т.п.н., а в совокупности составляет 1.68 млн п.н. Подобных ДМО не выявлено между двумя линиями ЭСК, проанализированными при тех же условиях. Дифференциально метилированные в ЭСК и ИПСК области можно подразделить на две группы. В первую группу входят ДМО, появление которых обусловлено «наследованием» паттерна метилирования от соматических клеток-предшественников ИПСК (44–49% от общего числа обнаруженных). Во вторую группу входят ДМО, паттерн метилирования которых специфичен для ИПСК, т.е. отличается от паттерна ДМО и в соматических клетках, и в ЭСК. Подобные ДМО составляют 51–56% от общего числа обнаруженных. Расположение ДМО варьирует в пяти изученных линиях ИПСК – 62% встречаются в двух из пяти линий, 16% – во всех пяти линиях. Эти районы можно считать «горячими точками» эпигенетического репрограммирования, которые требуют повышенного внимания при получении ИПСК. Значительное число ДМО (80%) ассоциированы с CpG-островками, 62% локализованы вблизи генов или в генах, 29 и 19% находятся в пределах 2 т.п.н. от точек старта или терминации транскрипции соответственно. Биоинформатический анализ функций генов, локализованных рядом с ДМО и встречающихся во всех проанализированных ИПСК, не выявил выраженного преобладания генов, вовлеченных в определенные клеточные процессы. Это говорит о том, что нарушение метилирования, происходящее при репрограммировании, может захватывать множество клеточных функций. Еще одна важная закономерность – преобладание (109 из 130, 92%) гипометилирования в ДМО во всех пяти линиях. По-видимому, нарушения репрограммирования метилома при получении ИПСК могут быть связаны с недостаточным метилированием.

Внимательный анализ и сравнение CpH-метилирования в ЭСК и ИПСК также выявили ДМО. Всего найдено 29 областей, которые характеризуются большой протяженностью (половина из них более 1 млн п.н., самая длинная – 4.8 млн п.н.), общая протяженность CpH-ДМО составляет 32.4 млн п.н. Большая часть CpH-ДМО в ИПСК гипометилирована по сравнению с ЭСК, они локализованы около центромер и теломер. Эти области обогащены гистонами H3, триметилированным по остатку лизина в положении 9 (H3K9me3), и солокализуются с гиперметилированными CpG-ДМО. Большая часть генов, локализованных в этих областях, характеризуется повышенным уровнем метилирования промоторных областей и, как следствие, сниженным уровнем транскрипции. Интересно, что в этих районах снижен уровень метки неактивного хроматина – H3K27me3. Таким образом, в ИПСК человека выявлены протяженные области,

ассоциированные с прицентромерными и прителомерными районами, в которых наблюдается абберрантное распределение модификаций гистонов, нарушен паттерн CpG- и CpH-метилирования, а также уровень транскрипции генов. Безусловно, подобные «горячие точки» эпигеномов должны подвергаться тщательному изучению при получении новых линий ИПСК человека [144].

Изучение CpG-метилирования в 22 линиях ИПСК человека, полученных из различных соматических клеток (клетки эндометрия, эпителия пупочной вены, клетки амниона, фетальные фибробласты легкого, клетки менструальной крови), также выявило отличия от ЭСК [186]. При сравнении всех линий ИПСК и ЭСК с использованием ДНК-микрочипа, содержащего пробы на 24273 CpG-сайтах в пределах 13728 генов, обнаружили 1459 дифференциально метилированных CpG-сайтов, соответствующих 1260 генам. Однако число и распределение данных сайтов значительно варьировали в различных линиях ИПСК. Вероятно, это связано с тем, что линии были получены из соматических клеток различного типа. Более чем в 15 линиях из 22 общими были только 20 сайтов. Интересно, что число подобных сайтов было повышено в ИПСК с набором половых хромосом XX. Сравнение этих данных с результатами Р. Листера и соавт. [144] выявило 72 промотора, дифференциально метилированных в обеих работах. Однако согласно [186] большинство ДМО в ИПСК гиперметилированы по сравнению с ЭСК, и постулируется тезис о том, что геном ИПСК более метилирован. В работе Р. Листера, напротив, отмечен недостаток метилирования CpG-динуклеотидов в ИПСК. Однако подобные различия вполне можно объяснить особенностями использованных экспериментальных подходов. В частности, в работе К. Нишино [186] анализировали CpG, расположенные в основном в пределах CpG-островков в промоторных областях генов, тогда как Р. Листер и соавт. определяли метилирование большинства остатков цитозина во всем геноме. Кроме того, ясно показано [186], что уровень абберрантного гиперметилирования на более поздних пассажах (30–40) значительно ниже, чем на ранних (4–6), тогда как Р. Листер и соавт. [144] использовали линии ИПСК, прошедшие десятки пассажей.

В ранних работах по получению ИПСК мыши и человека подчеркивалось удивительное сходство транскриптомов и эпигеномов этих клеток с транскриптомами и эпигеномами ЭСК. Кроме того, было показано, что на уровне всего генома происходит максимально полное изменение паттерна транскрипции генов соматических клеток. Однако позже установили, что ИПСК сохраняют некоторые, чаще очень малые, признаки соматических транскриптомов и эпи-

геномов [187, 188]. Неполное репрограммирование отдельных локусов, несмотря на его кажущуюся незначительность, может существенно влиять на свойства плюрипотентных клеток, меняя их способность к дифференцировке. Например, выявлено большое сходство ЭСК и ИПСК мыши на уровне транскрипции мРНК и микроРНК, за исключением нескольких транскриптов [189]. В частности, в некоторых клонах ИПСК наблюдался абберрантный сайленсинг импринтированного локуса *Dlk1-Dio3*, в том числе и в ИПСК, полученных из гемопоэтических клеток-предшественников, которые также характеризуются низким уровнем транскрипции данного локуса. Предполагается, что подобный эффект обусловлен «эпигенетической памятью». Нарушение транскрипции в локусе *Dlk1-Dio3* приводит к тому, что ИПСК неэффективно образуют химеры и не способны формировать организм мыши при тетраплоидной комплементации. Интересно, что обработка вальпроевой кислотой, ингибитором деацетилаз гистонов, приводит к активации транскрипции в локусе *Dlk1-Dio3* и восстановлению способности ИПСК к тетраплоидной комплементации и эффективному образованию химерных животных [189].

Исследованию влияния происхождения ИПСК на характер их дифференцировки посвящен ряд интересных работ [185, 186, 189, 190]. Например, было проведено сравнение свойств ИПСК, полученных из гемопоэтических и нейрональных предшественников, а также из фибробластов мыши, со свойствами ЭСК. Эмбриональные стволовые клетки имели разное происхождение: из бластоцист, полученных в результате переноса ядер из соматических клеток, и из бластоцист, полученных в результате естественного оплодотворения. Оказалось, что, во-первых, на эффективность и качество репрограммирования очень сильно влияет тип соматических клеток. ИПСК, полученные из гемопоэтических клеток, по молекулярно-генетическим характеристикам были более близки к ЭСК, тогда как ИПСК из фибробластов давали исключительно частично репрограммированные клоны. Наиболее близкими к ЭСК оказались ИПСК из нейрональных предшественников. Во-вторых, анализ метилирования ДНК выявил различия между ИПСК и плюрипотентными клетками, полученными из эмбрионов. Как и в более ранних работах обнаружено, что ИПСК и плюрипотентные клетки, полученные из эмбрионов, различались множеством ДМО. ИПСК, полученные из нейрональных предшественников и фибробластов, характеризуются остаточным метилированием локусов, ответственных за формирование гемопоэтической линии, что сказывается на сниженном уровне дифференцировки этих ИПСК в соответствующем направлении.

В-третьих, могут быть сняты ограничения направлений дифференцировки ИПСК, имеющих то или иное происхождение. Например, если ИПСК, полученные из нейрональных предшественников, дифференцировать в клетки гемопоэтического ряда, а затем получить из этих производных вторичные ИПСК, эти вторичные ИПСК будут иметь более высокий потенциал к дифференцировке в клетки крови. Кроме того, воздействие на эпигеном такими ингибиторами деацетилаз гистонов и метилирования ДНК, как трихостатин А и 5-азациитидин, может существенно снизить влияние происхождения клеток на их дифференцировку [187]. Следует отметить, что в данной работе [187] использовали ИПСК, взятые на очень ранних пассажах. Аберрантное метилирование остатков цитозина на ранних пассажах и, как следствие, нарушение паттерна экспрессии генов и дифференцировки ИПСК обнаружено и в других исследованиях. Например, показано, что ИПСК мыши, полученные из фибробластов, В-лимфоцитов, гранулоцитов костного мозга и клеток-предшественников скелетных мышц, обладают «эпигенетической памятью», что проявляется на уровне транскрипции и вызывает дифференцировку клеток преимущественно в клетки тех типов, из которых они были получены [190]. Обнаружено, что гены, являющиеся маркерами того или иного типа соматических клеток, могут продолжать экспрессироваться на высоком уровне в плюрипотентных клетках, при этом в их промоторных областях снижено содержание метки неактивного хроматина – H3K27me3, и повышен уровень меток активного хроматина – H3Ac и H3K4me3. При этом не найдено различий в метилировании промоторов этих генов [190]. Важно, что подобные нарушения транскрипции и сдвиги в дифференцировке клеток исчезают при продолжительном пассировании клонов ИПСК. Эти данные, а также результаты других работ говорят о том, что репрограммирование – процесс постепенный, становление полностью репрограммирован-

ного состояния эпигенома и клеток в целом требует множества раундов репликации генома.

Кроме рассмотренных работ, касающихся нарушений репрограммирования эпигеномов и «эпигенетической памяти» в ИПСК мыши, уже появилось несколько публикаций, подтверждающих наличие сходного феномена при репрограммировании клеток человека. Например, показано, что дифференцировка ИПСК, полученных из нейрональных предшественников, β-клеток поджелудочной железы и пигментного эпителия сетчатки глаза человека, может носить неслучайный характер, т.е. направление дифференцировки сильно сдвинуто в сторону предкового типа соматических клеток [188, 191, 192]. В ИПСК из клеток пуповинной крови и кератиноцитов новорожденного также выявлены аберрантно метилированные районы, а также установлено существование «эпигенетической памяти», что выражается в преимущественной дифференцировке в клетки родительского типа и сохраняется даже в ряду многих пассажей [193].

Таким образом, на сегодняшний день проблема «эпигенетической памяти» остается одной из основных в области получения и применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Решение этой проблемы крайне актуально, особенно в свете применения ИПСК в регенеративной медицине, а также в качестве моделей заболеваний человека. Решение этой проблемы не только позволит полноценно использовать ИПСК человека и животных в биомедицине, оно способно дать новые фундаментальные знания об устройстве и функционировании эпигеномов клеток в культуре и эмбриональном развитии организмов. ●

*Работа поддержана РФФИ  
(гранты № 11-04-00847-а и 12-04-00208-а),  
а также Программой РАН «Молекулярная  
и клеточная биология».*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boiani M., Scholer H.R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. № 11. P. 872–884.
- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Cohen D.E., Melton D. // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 4. P. 243–252.
- Grskovic M., Javaherian A., Strulovici B., Daley G.Q. // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. V. 10. № 12. P. 915–929.
- Tiscornia G., Vivas E.L., Belmonte J.C. // Nat. Med. 2011. V. 17. № 12. P. 1570–1576.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., et al. // Cell. 2005. V. 122. № 6. P. 947–956.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. № 4. P. 431–440.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart

- R., et al. // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
13. Maherali N., Hochedlinger K. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 6. P. 595–605.
  14. Anokye-Danso F., Trivedi C.M., Juhr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., Yang W., Gruber P.J., Epstein J.A., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 4. P. 376–388.
  15. Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D.L., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura M., Mimori K., Tanaka F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 6. P. 633–638.
  16. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilic J., Pekarik V., Tiscornia G., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1276–1284.
  17. Utikal J., Maherali N., Kulalert W., Hochedlinger K. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. Pt 19. P. 3502–3510.
  18. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1269–1275.
  19. Loh Y.H., Hartung O., Li H., Guo C., Sahalie J.M., Manos P.D., Urbach A., Heffner G.C., Grskovic M., Vigneault F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 1. P. 15–19.
  20. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Stem. Cells Dev.* 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
  21. Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 12. P. 890–894.
  22. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creighton M.P., Steine E.J., Cassidy J.P., Foreman R., et al. // *Cell*. 2008. V. 133. № 2. P. 250–264.
  23. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 3. P. 340–345.
  24. Yamanaka S. // *Cell*. 2009. V. 137. № 1. P. 13–17.
  25. Boland M.J., Hazen J.L., Nazor K.L., Rodriguez A.R., Gifford W., Martin G., Kupriyanov S., Baldwin K.K. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 91–94.
  26. Kang L., Wang J., Zhang Y., Kou Z., Gao S. // *Cell Stem. Cell*. 2009. V. 5. № 2. P. 135–138.
  27. Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.L., Ma Q.W., Wang L., et al. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 86–90.
  28. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 315–326.
  29. Azuara V., Perry P., Sauer S., Spivakov M., Jorgensen H.F., John R.M., Gouti M., Casanova M., Warnes G., Merkenschlager M., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 5. P. 532–538.
  30. Pan G., Tian S., Nie J., Yang C., Ruotti V., Wei H., Jonsdottir G.A., Stewart R., Thomson J.A. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 3. P. 299–312.
  31. Zhao X.D., Han X., Chew J.L., Liu J., Chiu K.P., Choo A., Orlov Y.L., Sung W.K., Shahab A., Kuznetsov V.A., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 3. P. 286–298.
  32. Creighton M.P., Markoulaki S., Levine S.S., Hanna J., Lodato M.A., Sha K., Young R.A., Jaenisch R., Boyer L.A. // *Cell*. 2008. V. 135. № 4. P. 649–661.
  33. Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., Brockman W., Kim T.K., Koche R.P., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7153. P. 553–560.
  34. Mohn F., Weber M., Rebhan M., Roloff T.C., Richter J., Stadler M.B., Bibel M., Schubeler D. // *Mol. Cell*. 2008. V. 30. № 6. P. 755–766.
  35. Liang J., Wan M., Zhang Y., Gu P., Xin H., Jung S.Y., Qin J., Wong J., Cooney A.J., Liu D., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2008. V. 10. № 6. P. 731–739.
  36. Pardo M., Lang B., Yu L., Prosser H., Bradley A., Babu M.M., Choudhary J. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 4. P. 382–395.
  37. Wang J., Rao S., Chu J., Shen X., Levasseur D.N., Theunissen T.W., Orkin S.H. // *Nature*. 2006. V. 444. № 7117. P. 364–368.
  38. van den Berg D.L., Snoek T., Mullin N.P., Yates A., Bezstarosti K., Demmers J., Chambers I., Poot R.A. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 4. P. 369–381.
  39. Ringrose L. // *Bioessays*. 2006. V. 28. № 4. P. 330–334.
  40. Ringrose L. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 3. P. 290–297.
  41. Hauenschild A., Ringrose L., Altmutter C., Paro R., Rehmsmeier M. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 10. P. e261.
  42. de Napoles M., Mermoud J.E., Wakao R., Tang Y.A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T.B., Silva J., Otte A.P., Vidal M., et al. // *Dev. Cell*. 2004. V. 7. № 5. P. 663–676.
  43. Wang H., Wang L., Erdjument-Bromage H., Vidal M., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. // *Nature*. 2004. V. 431. № 7010. P. 873–878.
  44. Elderkin S., Maertens G.N., Endoh M., Mallery D.L., Morrice N., Koseki H., Peters G., Brockdorff N., Hiom K. // *Mol. Cell*. 2007. V. 28. № 1. P. 107–120.
  45. Voncken J.W., Roelen B.A., Roefs M., de Vries S., Verhoeven E., Marino S., Deschamps J., van Lohuizen M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 5. P. 2468–2473.
  46. Lessard J., Sauvageau G. // *Nature*. 2003. V. 423. № 6937. P. 255–260.
  47. Park I.K., Qian D., Kiel M., Becker M.W., Pihalja M., Weissman I.L., Morrison S.J., Clarke M.F. // *Nature*. 2003. V. 423. № 6937. P. 302–305.
  48. Dovey J.S., Zacharek S.J., Kim C.F., Lees J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 33. P. 11857–11862.
  49. Molofsky A.V., Pardal R., Iwashita T., Park I.K., Clarke M.F., Morrison S.J. // *Nature*. 2003. V. 425. № 6961. P. 962–967.
  50. Liu J., Cao L., Chen J., Song S., Lee I.H., Quijano C., Liu H., Keyvanfar K., Chen H., Cao L.Y., et al. // *Nature*. 2009. V. 459. № 7245. P. 387–392.
  51. Endoh M., Endo T.A., Endoh T., Fujimura Y., Ohara O., Toyoda T., Otte A.P., Okano M., Brockdorff N., Vidal M., et al. // *Development*. 2008. V. 135. № 8. P. 1513–1524.
  52. Morey L., Pascual G., Cozzuto L., Roma G., Wutz A., Benitah S.A., Di Croce L. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 47–62.
  53. O'Loughlin A., Munoz-Cabello A.M., Gaspar-Maia A., Wu H.A., Banito A., Kunowska N., Racek T., Pemberton H.N., Beolchi P., Lavia F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 33–46.
  54. Morey L., Helin K. // *Trends Biochem. Sci.* 2010. V. 35. № 6. P. 323–332.
  55. Camahort R., Cowan C.A. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 4–6.
  56. Pasini D., Bracken A.P., Hansen J.B., Capillo M., Helin K. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 10. P. 3769–3779.
  57. Shumacher A., Faust C., Magnuson T. // *Nature*. 1996. V. 383. № 6597. P. 250–253.
  58. Faust C., Schumacher A., Holdener B., Magnuson T. // *Development*. 1995. V. 121. № 2. P. 273–285.
  59. Chamberlain S.J., Yee D., Magnuson T. // *Stem. Cells*. 2008. V. 26. № 6. P. 1496–1505.
  60. Shen X., Liu Y., Hsu Y.J., Fujiwara Y., Kim J., Mao X., Yuan G.C., Orkin S.H. // *Mol. Cell*. 2008. V. 32. № 4. P. 491–502.
  61. Peng J.C., Valouev A., Swigut T., Zhang J., Zhao Y., Sidow A., Wysocka J. // *Cell*. 2009. V. 139. № 7. P. 1290–1302.
  62. Shen X., Kim W., Fujiwara Y., Simon M.D., Liu Y., Mysliwiec M.R., Yuan G.C., Lee Y., Orkin S.H. // *Cell*. 2009. V. 139. № 7. P. 1303–1314.
  63. Pasini D., Cloos P.A., Walfridsson J., Olsson L., Bukowski J.P., Johansen J.V., Bak M., Tommerup N., Rappsilber J., Helin K. //

- Nature. 2010. V. 464. № 7286. P. 306–310.
64. Zhang Z., Jones A., Sun C.W., Li C., Chang C.W., Joo H.Y., Dai Q., Mysliwiec M.R., Wu L.C., Guo Y., et al. // *Stem. Cells*. 2011. V. 29. № 2. P. 229–240.
65. Li G., Margueron R., Ku M., Chambon P., Bernstein B.E., Reinberg D. // *Genes Dev*. 2010. V. 24. № 4. P. 368–380.
66. Landeira D., Sauer S., Poot R., Dvorkina M., Mazzarella L., Jorgensen H.F., Pereira C.F., Leleu M., Piccolo F.M., Spivakov M., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2010. V. 12. № 6. P. 618–624.
67. Zhang Z., Jones A., Sun C.W., Li C., Chang C.W., Joo H.Y., Dai Q., Mysliwiec M.R., Wu L.C., Guo Y., et al. // *Stem. Cells*. 2011. V. 29. № 2. P. 229–240.
68. Landeira D., Fisher A.G. // *Trends Cell Biol*. 2011. V. 21. № 2. P. 74–80.
69. Stock J.K., Giadrossi S., Casanova M., Brookes E., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N., Fisher A.G., Pombo A. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. № 12. P. 1428–1435.
70. Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. // *Cell*. 2007. V. 130. № 1. P. 77–88.
71. Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A., Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., et al. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7091. P. 349–353.
72. Lee T.I., Jenner R.G., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B., Johnstone S.E., Cole M.F., Isono K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 301–313.
73. Ringrose L., Paro R. // *Annu Rev. Genet*. 2004. V. 38. P. 413–443.
74. Ang Y.S., Tsai S.Y., Lee D.F., Monk J., Su J., Ratnakumar K., Ding J., Ge Y., Darr H., Chang B., et al. // *Cell*. 2011. V. 145. № 2. P. 183–197.
75. Dou Y., Milne T.A., Ruthenburg A.J., Lee S., Lee J.W., Verdine G.L., Allis C.D., Roeder R.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006. V. 13. № 8. P. 713–719.
76. Cao F., Chen Y., Cierpicki T., Liu Y., Basur V., Lei M., Dou Y. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. P. e14102.
77. Pullirsch D., Hartel R., Kishimoto H., Leeb M., Steiner G., Wutz A. // *Development*. 2010. V. 137. № 6. P. 935–943.
78. Wysocka J., Swigut T., Milne T.A., Dou Y., Zhang X., Burlingame A.L., Roeder R.G., Brivanlou A.H., Allis C.D. // *Cell*. 2005. V. 121. № 6. P. 859–872.
79. Kim J.K., Huh S.O., Choi H., Lee K.S., Shin D., Lee C., Nam J.S., Kim H., Chung H., Lee H.W., et al. // *Mol. Cell Biol*. 2001. V. 21. № 22. P. 7787–7795.
80. Wu J.I., Lessard J., Olave I.A., Qiu Z., Ghosh A., Graef I.A., Crabtree G.R. // *Neuron*. 2007. V. 56. № 1. P. 94–108.
81. Wu J.I., Lessard J., Crabtree G.R. // *Cell*. 2009. V. 136. № 2. P. 200–206.
82. Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staahl B.T., Wu H., Abersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. // *Neuron*. 2007. V. 55. № 2. P. 201–215.
83. Ho L., Jothi R., Ronan J.L., Cui K., Zhao K., Crabtree G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 13. P. 5187–5191.
84. Ho L., Ronan J.L., Wu J., Staahl B.T., Chen L., Kuo A., Lessard J., Nesvizhskii A.I., Ranish J., Crabtree G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 13. P. 5181–5186.
85. Roberts C.W., Galusha S.A., McMenamin M.E., Fletcher C.D., Orkin S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 25. P. 13796–13800.
86. Bultman S.J., Gebuhr T.C., Pan H., Svoboda P., Schultz R.M., Magnuson T. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. № 13. P. 1744–1754.
87. Gao X., Tate P., Hu P., Tjian R., Skarnes W.C., Wang Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 18. P. 6656–6661.
88. Guidi C.J., Sands A.T., Zambrowicz B.P., Turner T.K., Demers D.A., Webster W., Smith T.W., Imbalzano A.N., Jones S.N. // *Mol. Cell Biol*. 2001. V. 21. № 10. P. 3598–3603.
89. Fazio T.G., Huff J.T., Panning B. // *Cell*. 2008. V. 134. № 1. P. 162–174.
90. Schaniel C., Ang Y.S., Ratnakumar K., Cormier C., James T., Bernstein E., Lemischka I.R., Paddison P.J. // *Stem. Cells*. 2009. V. 27. № 12. P. 2979–2991.
91. Seki Y., Kurisaki A., Watanabe-Susaki K., Nakajima Y., Nakanishi M., Arai Y., Shiota K., Sugino H., Asashima M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 24. P. 10926–10931.
92. Hu G., Kim J., Xu Q., Leng Y., Orkin S.H., Elledge S.J. // *Genes Dev*. 2009. V. 23. № 7. P. 837–848.
93. Singhal N., Graumann J., Wu G., Arauzo-Bravo M.J., Han D.W., Greber B., Gentile L., Mann M., Scholer H.R. // *Cell*. 2010. V. 141. № 6. P. 943–955.
94. He L., Liu H., Tang L. // *Stem. Cell Rev*. 2012. V. 8. № 1. P. 128–136.
95. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. // *EMBO J*. 1999. V. 18. № 15. P. 4261–4269.
96. Ho L., Miller E.L., Ronan J.L., Ho W.Q., Jothi R., Crabtree G.R. // *Nat. Cell Biol*. 2011. V. 13. № 8. P. 903–913.
97. Denslow S.A., Wade P.A. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 37. P. 5433–5438.
98. McDonel P., Costello I., Hendrich B. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009. V. 41. № 1. P. 108–116.
99. Kaji K., Caballero I.M., MacLeod R., Nichols J., Wilson V.A., Hendrich B. // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. № 3. P. 285–292.
100. Zhu D., Fang J., Li Y., Zhang J. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 11. P. e7684.
101. Kaji K., Nichols J., Hendrich B. // *Development*. 2007. V. 134. № 6. P. 1123–1132.
102. Reynolds N., Salmon-Divon M., Dvinge H., Hynes-Allen A., Balasooriya G., Leaford D., Behrens A., Bertone P., Hendrich B. // *EMBO J*. 2011. V. 31. № 3. P. 593–605.
103. Yildirim O., Li R., Hung J.H., Chen P.B., Dong X., Ee L.S., Weng Z., Rando O.J., Fazio T.G. // *Cell*. 2011. V. 147. № 7. P. 1498–1510.
104. Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M. // *Cell*. 2011. V. 146. № 6. P. 866–872.
105. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., et al. // *Science*. 2009. V. 324. № 5929. P. 930–935.
106. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7310. P. 1129–1133.
107. Koh K.P., Yabuuchi A., Rao S., Huang Y., Cunniff K., Nardone J., Laiho A., Tahiliani M., Sommer C.A., Mostoslavsky G., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 2. P. 200–213.
108. Inoue A., Zhang Y. // *Science*. 2011. V. 334. № 6053. P. 194.
109. Iqbal K., Jin S.G., Pfeifer G.P., Szabo P.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 9. P. 3642–3647.
110. Ikura T., Ogryzko V.V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. // *Cell*. 2000. V. 102. № 4. P. 463–473.
111. Cai Y., Jin J., Tomomori-Sato C., Sato S., Sorokina I., Parmely T.J., Conaway R.C., Conaway J.W. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. № 44. P. 42733–42736.
112. Sapountzi V., Logan I.R., Robson C.N. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2006. V. 38. № 9. P. 1496–1509.
113. Squatrito M., Gorrini C., Amati B. // *Trends Cell Biol*. 2006. V. 16. № 9. P. 433–442.
114. Herceg Z., Hulla W., Gell D., Cuenin C., Leonart M., Jackson S., Wang Z.Q. // *Nat. Genet*. 2001. V. 29. № 2. P. 206–211.
115. Gorrini C., Squatrito M., Luise C., Syed N., Perna D., Wark L., Martinato F., Sardella D., Verrecchia A., Bennett S., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7157. P. 1063–1067.
116. Loh Y.H., Zhang W., Chen X., George J., Ng H.H. // *Genes Dev*. 2007. V. 21. № 20. P. 2545–2557.

117. Chen X., Xu H., Yuan P., Fang F., Huss M., Vega V.B., Wong E., Orlov Y.L., Zhang W., Jiang J., et al. // *Cell*. 2008. V. 133. № 6. P. 1106–1117.
118. Sims R.J., 3rd, Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 51. P. 41789–41792.
119. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., Sridharan R., Mason M.J., Heidersbach A., Ramalho-Santos J., McManus M.T., Plath K., Meshorer E., et al. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7257. P. 863–868.
120. Kooistra S.M., van den Boom V., Thummer R.P., Johannes F., Wardenaar R., Tesson B.M., Veenhoff L.M., Fusetti F., O'Neill L.P., Turner B.M., et al. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 10. P. 1703–1714.
121. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. № 8. P. 5453–5465.
122. Cedar H., Bergman Y. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. № 5. P. 295–304.
123. Bestor T.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 16. P. 2395–2402.
124. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. // *Cell*. 1992. V. 69. № 6. P. 915–926.
125. Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., et al. // *Nature*. 2004. V. 430. № 6998. P. 471–476.
126. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. // *Cell*. 1999. V. 99. № 3. P. 247–257.
127. Reik W. // *Nature*. 2007. V. 447. № 7143. P. 425–432.
128. Straussman R., Nejman D., Roberts D., Steinfeld I., Blum B., Benvenisty N., Simon I., Yakhini Z., Cedar H. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 5. P. 564–571.
129. Fouse S.D., Shen Y., Pellegrini M., Cole S., Meissner A., van Neste L., Jaenisch R., Fan G. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 2. № 2. P. 160–169.
130. Hattori N., Nishino K., Ko Y.G., Ohgane J., Tanaka S., Shiota K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 17. P. 17063–17069.
131. Hattori N., Imao Y., Nishino K., Ohgane J., Yagi S., Tanaka S., Shiota K. // *Genes Cells*. 2007. V. 12. № 3. P. 387–396.
132. Li J.Y., Pu M.T., Hirasawa R., Li B.Z., Huang Y.N., Zeng R., Jing N.H., Chen T., Li E., Sasaki H., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 24. P. 8748–8759.
133. Li E., Beard C., Jaenisch R. // *Nature*. 1993. V. 366. № 6453. P. 362–365.
134. Kaneda M., Okano M., Hata K., Sado T., Tsujimoto N., Li E., Sasaki H. // *Nature*. 2004. V. 429. № 6994. P. 900–903.
135. Ueda Y., Okano M., Williams C., Chen T., Georgopoulos K., Li E. // *Development*. 2006. V. 133. № 6. P. 1183–1192.
136. Tsumura A., Hayakawa T., Kumaki Y., Takebayashi S., Sakaue M., Matsuoka C., Shimotohno K., Ishikawa F., Li E., Ueda H.R., et al. // *Genes Cells*. 2006. V. 11. № 7. P. 805–814.
137. Feldman N., Gerson A., Fang J., Li E., Zhang Y., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 2. P. 188–194.
138. Bird A. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 1. P. 6–21.
139. Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B.E., Nusbaum C., Jaffe D.B., et al. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7205. P. 766–770.
140. Thomson J.P., Skene P.J., Selfridge J., Clouaire T., Guy J., Webb S., Kerr A.R., Deaton A., Andrews R., James K.D., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7291. P. 1082–1086.
141. Ooi S.K., Qiu C., Bernstein E., Li K., Jia D., Yang Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Lin S.P., Allis C.D., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7154. P. 714–717.
142. Ramsahoye B.H., Biniszkiwicz D., Lyko F., Clark V., Bird A.P., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 10. P. 5237–5242.
143. Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.M., et al. // *Nature*. 2009. V. 462. № 7271. P. 315–322.
144. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7336. P. 68–73.
145. Ziller M.J., Muller F., Liao J., Zhang Y., Gu H., Bock C., Boyle P., Epstein C.B., Bernstein B.E., Lengauer T., et al. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 12. P. e1002389.
146. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7200. P. 49–55.
147. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 5. P. 937–946.
148. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7151. P. 313–317.
149. Bhutani N., Brady J.J., Damian M., Sacco A., Corbel S.Y., Blau H.M. // *Nature*. 2010. V. 463. № 7284. P. 1042–1047.
150. Shi Y., Desponts C., Do J.T., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 5. P. 568–574.
151. Sado T., Wang Z., Sasaki H., Li E. // *Development*. 2001. V. 128. № 8. P. 1275–1286.
152. Mak W., Nesterova T.B., de Napoles M., Appanah R., Yamanaka S., Otte A.P., Brockdorff N. // *Science*. 2004. V. 303. № 5658. P. 666–669.
153. Okamoto I., Otte A.P., Allis C.D., Reinberg D., Heard E. // *Science*. 2004. V. 303. № 5658. P. 644–649.
154. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L., Eggen A., Avner P., Duret L. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 6. P. 894–908.
155. Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., McCabe V.M., Norris D.P., Cooper P.J., Swift S., Rastan S. // *Cell*. 1992. V. 71. № 3. P. 515–526.
156. Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. № 4. P. 400–404.
157. Lee J.T., Lu N. // *Cell*. 1999. V. 99. № 1. P. 47–57.
158. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 12. P. 4820–4825.
159. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 1. P. 55–70.
160. Tchieu J., Kuoy E., Chin M.H., Trinh H., Patterson M., Sherman S.P., Aimiwu O., Lindgren A., Hakimian S., Zack J.A., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 3. P. 329–342.
161. Lengner C.J., Gimelbrant A.A., Erwin J.A., Cheng A.W., Guenther M.G., Welstead G.G., Alagappan R., Frampton G.M., Xu P., Muffat J., et al. // *Cell*. 2010. V. 141. № 5. P. 872–883.
162. Hanna J., Cheng A.W., Saha K., Kim J., Lengner C.J., Soldner F., Cassady J.P., Muffat J., Carey B.W., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227.
163. Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., Chureau C., Morey C., Rougeulle C., Avner P. // *Science*. 2008. V. 321. № 5896. P. 1693–1695.
164. Navarro P., Moffat M., Mullin N.P., Chambers I. // *Hum. Genet.* 2011. V. 130. № 2. P. 255–264.
165. Barakat T.S., Gunhanlar N., Pardo C.G., Achame E.M., Ghazvini M., Boers R., Kenter A., Rentmeester E., Grootegoed J.A., Gribnau J. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 1. P. e1002001.
166. Orkin S.H., Hochedlinger K. // *Cell*. 2011. V. 145. № 6. P. 835–850.
167. Navarro P., Oldfield A., Legoupi J., Festuccia N., Dubois A., Attia M., Schoorlemmer J., Rougeulle C., Chambers I., Avner P. // *Nature*. 2010. V. 468. № 7322. P. 457–460.

168. Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., Xu N., Lee J.T. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7251. P. 128–132.
169. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
170. Mattout A., Biran A., Meshorer E. // *J. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 3. № 6. P. 341–350.
171. Shi Y., Do J.T., Despons C., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 2. № 6. P. 525–528.
172. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 795–797.
173. Mali P., Chou B.K., Yen J., Ye Z., Zou J., Dowey S., Brodsky R.A., Ohm J.E., Yu W., Baylin S.B., et al. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 713–720.
174. Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L., Esteban M.A., Pan G., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 9. № 6. P. 575–587.
175. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
176. Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Kanagawa O., Nakagawa M., Okita K., Yamanaka S. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1132–1135.
177. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A., Wahl G.M., Belmonte J.C. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1140–1144.
178. Marion R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1149–1153.
179. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Canamero M., Blasco M.A., Serrano M. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1136–1139.
180. Ruiz S., Panopoulos A.D., Herrerias A., Bissig K.D., Lutz M., Berggren W.T., Verma I.M., Izpisua Belmonte J.C. // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 1. P. 45–52.
181. Onder T.T., Kara N., Cherry A., Sinha A.U., Zhu N., Bernt K.M., Cahan P., Mancarci O.B., Unternaehrer J., Gupta P.B., et al. // *Nature*. 2012. V. 483. № 7391. P. 598–602.
182. Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R., Young R.A. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 2. P. 249–257.
183. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiwu O., Richter L., Zhang J., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2009. V. 5. № 1. P. 111–123.
184. Newman A.M., Cooper J.B. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 2. P. 258–262.
185. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., et al. // *Cell*. 2011. V. 144. № 3. P. 439–452.
186. Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H., Umezawa A. // *PLoS Genet*. 2011. V. 7. № 5. P. e1002085.
187. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I., et al. // *Nature*. 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
188. Bar-Nur O., Russ H.A., Efrat S., Benvenisty N. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 9. № 1. P. 17–23.
189. Stadtfeld M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 175–181.
190. Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 848–855.
191. Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. P. e7076.
192. Hu Q., Friedrich A.M., Johnson L.V., Clegg D.O. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 11. P. 1981–1991.
193. Kim K., Zhao R., Doi A., Ng K., Unternaehrer J., Cahan P., Hongguang H., Loh Y.H., Aryee M.J., Lensch M.W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 12. P. 1117–1119.

УДК 576

## Влияние 3D-условий культивирования на дифференцировку энтодермальных клеток

О. С. Петракова<sup>1,2\*</sup>, В. В. Ашапкин<sup>3,4</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>1</sup>, Е. Ю. Брагин<sup>4</sup>, В. Ю. Штратникова<sup>4</sup>, Е. С. Черниогло<sup>1</sup>, Ю. В. Суханов<sup>1</sup>, В. В. Терских<sup>1</sup>, А. В. Васильев<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</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>4</sup>Инновационно-технологический центр «Биологически активные соединения и их применение» РАН, 117312, Москва, ул. Губкина, 3, стр. 2

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2012

**РЕФЕРАТ** Клеточная терапия органов энтодермального происхождения представляет собой одну из важных задач современной клеточной биологии и биотехнологии. Наиболее перспективным направлением в этой области является изучение возможностей трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. На примере анализа дифференцировочного потенциала энтодермальных протоковых клеток слюнной железы мыши в коллагеновом геле рассматривается один из подходов к изучению пластичности клеточного фенотипа *in vitro* – культивирование клеток в трехмерном матриксе (3D). Получены культуры постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы и постнатальных прогениторных клеток печени мыши и проведена их сравнительная характеристика в 2D- и 3D-условиях культивирования. Показано, что оба типа клеток активно пролиферируют в 2D-условиях и проходят более 20 пассажей. В 2D-условиях культивирования клетки находятся в малодифференцированном состоянии. При переходе в 3D-условия клетки подвергаются дифференцировке, о чем свидетельствует замедление их пролиферации и увеличение экспрессии дифференцировочных маркеров. Клетки слюнной железы способны к трансдифференцировке в гепатоцитарном и панкреатическом направлениях. При культивировании в коллагеновом геле для клеток слюнной железы характерно снижение экспрессии протоковых маркеров и увеличение экспрессии гепатоцитарных маркеров. Прогениторные клетки печени при культивировании в 3D-условиях также приобретают способность к дифференцировке в панкреатическом направлении. Таким образом, постнатальные клетки слюнной железы проявляют значительную фенотипическую пластичность в пределах энтодермального зародышевого листка, они могут служить перспективным источником энтодермальных клеток для заместительной клеточной терапии заболеваний печени. Культивирование клеток в 3D-условиях является удобной моделью *in vitro*-анализа дифференцировочного потенциала клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка, коллагеновый гель, 3D-условия культивирования, клетки подчелюстной слюнной железы, прогениторные клетки печени, энтодерма.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 2D-условия – двумерные условия (2-dimensional); 3D-условия – трехмерные условия (3-dimensional); ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; ПКСЖ – постнатальные клетки слюнной железы; ППКП – постнатальные прогениторные клетки печени; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridine (5-бром-2'-дезоксинуридин); DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамин-2-фенилиндол); EGF – Epidermal Growth Factor (эпидермальный фактор роста); ITS – Insulin-Transferrin-Selenium (инсулин-трансферрин-селенит натрия).

**ВВЕДЕНИЕ**

Актуальной проблемой современной клеточной биологии является изучение пластичности клеточного фенотипа и возможностей трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. Это может не только помочь в решении таких фундаментальных задач, как понимание путей дифференцировки клеток в процессе эмбриогенеза, установление гистогенетического родства клеток различного типа, но и обозначить новые подходы в регенеративной медицине.

Возможности клеточной терапии патологий печени активно изучаются. Несмотря на некоторые успехи, полученные в опытах на лабораторных животных, безопасный и достаточно эффективный подход еще не найден [1, 2]. Основную задачу представляет поиск легкодоступных клеток, способных с достаточной эффективностью дифференцироваться в гепатоцитарном направлении. Наиболее хорошо изучены на данный момент с точки зрения экспериментальных и клинических испытаний эмбриональные стволовые клетки [3–6], мезенхимные клетки костного мозга [7–9] и жировой ткани [10–12], клетки амниотической жидкости [13, 14]. Однако во всех работах показана лишь частичная трансдифференцировка, и не достигнуто функционально активное состояние. Таким образом, работы по поиску оптимального источника клеток для терапии патологий печени остаются актуальными.

Слюнная железа является относительно мало изученным источником энтодермальных клеток. Однако доступность клеточного материала слюнной железы, возможность применять ее клетки в аутологичном и аллогенном вариантах, а также относительно малая травматичность процедуры взятия биоптата делают этот источник энтодермальных клеток перспективным для дальнейшего изучения.

На данный момент накоплено достаточно сведений о культивировании *in vitro* клеток слюнной железы человека и различных животных. Культивируемые *in vitro* клетки слюнной железы представляют собой активно пролиферирующую культуру, способную проходить значительное число пассажей [15]. Для клеток слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья) характерна экспрессия цитокератинов 18 и 19 и зачастую  $\alpha$ -фетопротеина [16, 17]. При определенных условиях культивирования эти клетки приобретают способность к синтезу глюкагона, альбумина либо инсулина [18].

В представленной работе мы рассматриваем один из подходов к изучению пластичности клеточного фенотипа *in vitro* – культивирование клеток в трехмерном матриксе (3D-условия) на примере геля из коллагена типа I. Культивирование клеток в кол-

лагеновом геле применяют для изучения морфогенетического потенциала клеток [19, 20], клеточной миграции [21] и оценки дифференцировочного потенциала [22]. Помимо этого, культивирование  $\beta$ -клеток поджелудочной железы в 4% геле из коллагена типа I способствует их лучшей выживаемости и повышает их функциональную активность [23]. Что касается клеток слюнной железы, то при культивировании в 3D-условиях (матригель) постнатальные клетки слюнной железы (ПКСЖ) мыши приобретают способность к экспрессии  $\alpha$ -фетопротеина и альбумина, что характерно для гепатоцитарной дифференцировки [16]. Как известно, коллаген типа I наряду с фибронектином является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса печени. Таким образом, данная работа может не только помочь в изучении дифференцировочных свойств энтодермальных клеток, но и позволит оценить способность коллагенового матрикса инициировать и поддерживать гепатоцитарную дифференцировку клеток *in vitro*.

Цель нашей работы состояла в изучении способности клеток слюнной железы мыши дифференцироваться в гепатоцитарном направлении при культивировании в коллагеновом геле.

Нами проведен сравнительный анализ свойств клеток подчелюстной слюнной железы мыши и прогениторных клеток, выделенных из печени. Сравнение морфологических, иммунофенотипических и биохимических характеристик культур клеток проведено в 2D- и 3D-условиях культивирования, проанализирован также профиль экспрессии генов этих клеток с помощью ПЦР.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Животные**

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 8–20 нед. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

**Выделение и культивирование постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы мыши и прогениторных клеток печени**

Для получения культур клеток печени и подчелюстной слюнной железы мыши животных препарировали после наркотизации хлороформом. Шею и живот протирали спиртом, кожу разрезали стерильными ножницами и извлекали пинцетом обе подчелюстные слюнные железы и печень. Органы переносили в стерильные пробирки со средой DMEM/F12 1 : 1 («Gibco») и 40 мкг/мл гентамицина. После измельче-

ния органов и удаления кровеносных сосудов и мезенхимных тканей гомогенат слюнной железы и печени дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем обрабатывали раствором коллагеназы типа IV (4 мг/мл, «Sigma») в среде DMEM/F12 1 : 1 в течение 30–40 мин при 37°C. Суспензии клеток пипетировали и пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, чтобы отделить мелкие клетки от более крупных полиплоидных. Клетки дважды промывали средой культивирования. При этом использовали «мягкое» центрифугирование в течение 2 мин при 100 *g*. В этих условиях происходило удаление эритроцитов и осаждение преимущественно мелких клеток, обладающих большей удельной плотностью. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в полной среде культивирования, содержащей DMEM/F12 1 : 1, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone»), 2 mM глутамин («Gibco»), 1× ITS («Invitrogen») и 10 нг/мл EGF («Invitrogen»). Клетки высаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные чашки («Corning») из расчета 5 × 10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в стандартных условиях при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В течение первых 5 дней среду заменяли каждый день, а в дальнейшем – 1 раз в 3 дня. При пассировании клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали с 0.25% трипсином в течение 5 мин при 37°C. Рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные чашки, разводя в соотношении 1 : 3.

#### **Приготовление коллагенового геля, культивирование клеток в 3D-условиях, контракция коллагенового геля**

Коллагеновый гель готовили по стандартной методике: коллаген типа I получали из хвостов крыс по описанной ранее методике [20], растворяли в стерильной 0.1% уксусной кислоте в концентрации 5 мг/мл. Клетки на первом пассаже снимали трипсином и разводили в фосфатно-солевом буфере, исходя из расчета, что конечная концентрация клеток составляет 1 × 10<sup>6</sup> клеток/мл геля. Перед приготовлением геля все материалы охлаждали до +4°C, последующие операции выполняли на холоду. В отдельную пробирку добавляли стерильные компоненты в следующей очередности: 0.34 M NaOH («Sigma») до конечной концентрации 0.023 mM, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> («ПанЭко») до конечной концентрации 0.26%, 10× DMEM («Sigma») до конечной концентрации 1×, 100× глутамин («Gibco») до конечной концентрации 2 mM, 100× HEPES («Gibco») до конечной концентрации 1×, эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота («HyClone») до конечной концентрации 10%. Затем добавляли раствор коллагена в уксусной кислоте до конечной концентрации коллагена 4%. После этого 2–3 раза пере-

мешивали и добавляли клетки в фосфатно-солевом буфере, перемешивали еще 1–2 раза и помещали гель в 35-мм чашки Петри по 2 мл на чашку. Гель инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин до полного застывания. После полимеризации геля в чашки добавляли по 2 мл полной ростовой среды, гель отделяли от стенок чашки наконечником пипетки. Помещали гель в CO<sub>2</sub>-инкубатор, это время считали нулевым часом приготовления геля. Далее клетки в геле культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в стандартных условиях, среду меняли каждые 2 дня. Для определения степени контракции геля, измеряли его диаметр каждые 24 ч, считая от времени приготовления. В качестве отрицательного контроля контракции использовали гель без клеток.

#### **Иммуногистохимия**

Коллагеновый гель инкубировали с 4% параформальдегидом в течение 30 мин при комнатной температуре, затем заключали в парафин по стандартной методике и готовили парафиновые срезы толщиной 40 мкм. Срезы окрашивали азур-эозином.

#### **Иммуноцитохимия**

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки рассаживали на покрытые коллагеном типа I чашки за 48 ч до фиксации. Фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали фосфатно-солевым буфером с 0.1% Тритоном X-100 и проводили блокировку 1% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере в течение 30 мин при комнатной температуре. Инкубировали с первичными антителами в фосфатно-солевом буфере в течение 60 мин при 37°C (или при +4°C в течение ночи) в разведении, рекомендованном производителем (обычно 1 : 200–1 : 500). Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, после чего инкубировали с вторичными антителами в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. Снова отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, добавляя во время последней отмывки DAPI («Sigma»). Анализировали под флуоресцентным микроскопом. Список использованных антител представлен в *табл. 1*.

При анализе клеток после 10 дней культивирования в 3D-условиях гель промывали фосфатно-солевым буфером, измельчали и инкубировали с 0.075% коллагеназой типа II («Sigma») в течение 60 мин при 37°C. После растворения геля клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях (CO<sub>2</sub>-инкубатор, 48 ч). Затем проводили стандартную процедуру окрашивания (см. выше).

Таблица 1. Антитела, использованные в работе

Антитело	Антиген	Фирма, каталожный номер
Первичные антитела		
СК19	Цитокератин 19	«AbCam», # ab15463-1
ALB	Альбумин	«R & D», # MAB1455
СУР Р450	Цитохром Р450 1А1	«Millipore», # AB1258
BrdU	Бромдезоксисуридин	«AbCam», # ab8152
Вторичные антитела		
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (H + L)		«Invitrogen», # A-21206
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H + L)		«Invitrogen», # A-11029

### Определение пролиферативной активности клеток с помощью бромдезоксисуридина

Пролиферативную активность клеток при культивировании в 2D- и 3D-условиях определяли по способности клеток включать бромдезоксисуридин (BrdU). За 15 ч до фиксации к клеткам добавляли BrdU («Sigma») до конечной концентрации 10 мкМ. Затем при культивировании в 2D-условиях клетки промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали в 70% этаноле (30 мин, +4°C). Добавляли эквивалентный объем 4 н. HCl, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Промывали клетки фосфатно-солевым буфером до достижения нейтральных значений pH, инкубировали с первичными антителами к BrdU в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 60 мин при 37°C. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, затем инкубировали клетки с вторичными антителами (разведение 1 : 1000) в течение 60 мин при 37°C. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, во время последней отмывки добавляли DAPI («Sigma»). Анализировали клетки под флуоресцентным микроскопом, для статистического анализа подсчитывали 5000 клеток.

Для подсчета доли пролиферирующих клеток после 10 дней культивирования в 3D-условиях клетки инкубировали с 10 мкМ BrdU в течение 15 ч, затем промывали фосфатно-солевым буфером, измельчали и инкубировали с коллагеназой типа II («Sigma») в течение 60 мин при 37°C. После растворения геля клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После прикрепления клеток проводили такую же процедуру окраски, как для 2D-условий (см. выше).

Для анализа особенностей роста клеток и выявления закономерностей морфогенеза в 3D-условиях окрашивали гель антителами к BrdU. После 10 дней культивирования клеток в геле добавляли в среду 10 мкМ BrdU на 15 ч, затем гель фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре. Гель инкубировали в 70% этаноле (30 мин, +4°C), добавляли эквивалентный объем 4 н. HCl, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Промывали гель фосфатно-солевым буфером до нейтральных значений pH, инкубировали с первичными антителами к BrdU в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 16 ч на шейкере при комнатной температуре. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере на шейкере при комнатной температуре, затем инкубировали клетки с вторичными антителами (разведение 1 : 1000) в течение 2 ч на шейкере при комнатной температуре. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, во время последней отмывки добавляли DAPI («Sigma»). Анализировали клетки под флуоресцентным микроскопом.

### Выделение суммарной РНК из клеток

Суммарную РНК выделяли из клеток на первом пассаже в случае культивирования в 2D-условиях и после 10 дней инкубации в геле при культивировании клеток в 3D-условиях. Для выделения РНК из клеток, культивируемых в 3D-условиях, гель растворяли коллагеназой типа II, клетки осаждали центрифугированием. РНК выделяли при помощи набора AllPrep DNA/RNA Mini Kit («Qiagen») по инструкциям производителя. Концентрацию РНК определяли на мини-флуориметре Qubit с помощью RNA Assay Kit («Invitrogen»). Для обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу Superscript II («Invitrogen») со случайными праймерами. В реакцию брали 500 нг суммарной РНК.

### Анализ клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши методом ОТ-ПЦР

ОТ-ПЦР проводили при помощи набора ScreenMix («Евроген») по инструкциям производителя. Условия реакции: предварительная инкубация при 95°C в течение 5 мин для активации ДНК-полимеразы, затем 25–30 циклов: денатурация – 95°C, 15 с; отжиг – 57–59°C, 15 с; элонгация – 72°C, 1 мин. Перечень использованных маркеров и температура плавления праймеров представлены в табл. 2.

### Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1.5% агарозном геле («Helicon») и буфере TAE («ПанЭко») при напряжении 80 В. В качестве маркеров молекулярного веса ис-

Таблица 2. Праймеры, использованные в ОТ-ПЦР

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ампликон, п.н.	T <sub>пл.</sub> , °C
mGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'	95	62.6 62.6
mKRT8	Keratin 8 (кератин 8)	5'-TCC ATC AGG GTG ACT CAG AAA-3' 5'-AAG GGG CTC AAC AGG CTC T-3'	242	60.1 60.0
mKRT14	Keratin 14 (кератин 14)	5'-GGC TGG AGC AGG AGA TCG CCA-3' 5'-AGG ACC TGC TCG TGG GTG GAG ACCA-3'	90	61.0 62.0
mKRT19	Keratin 19 (кератин 19)	5'-GGG GGT TCA GTA CGC ATT GG-3' 5'-GAG GAC GAG GTC ACG AAG C-3'	113	62.9 62.1
mAFP	Alpha fetoprotein (α-фетопротейн)	5'-CCA TCA CCT TTA CCC AGT TTG T-3' 5'-CCC ATC GCC AGA GTT TTT CTT-3'	101	60.2 60.6
m1AAT	Alpha-1-antitrypsin (α-1-антитрипсин)	5'-CTC GTC CGC TCA CTA AAC AAG-3' 5'-GCT GTC TGA GAG TCA AGG TCT T-3'	248	60.7 61.3
mTAT	Tyrosine aminotransferase (тирозин-аминотрансфераза)	5'-AGC CGA ATC CGA ACA AAA CC-3' 5'-GCC GAT AGA TGG GGC ATA GC-3'	146	60.9 61.3
mPEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (фосфоенолпируват-карбоксиказа 1)	5'-TGA CAG ACT CGC CCT ATG TG-3' 5'-CCC AGT TGT TGA CCA AAG GC-3'	153	61.0 61.4
mALB	Albumin (альбумин)	5'-TGC TTT TTC CAG GGG TGT GTT-3' 5'-TTA CTT CCT GCA CTA ATT TGG CA-3'	167	62.4 60.2
mCYP 3A13	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13 (цитохром P450 семейства 3, подсемейство a, полипептид 13)	5'-ATG AGG CAG GGA TTA GGA GAA G-3' 5'-TGA GAG GAA CAG TGG ATC AAA GA-3'	189	60.7 60.7
mIns2	Insulin-2 preproprotein (инсулин 2 белок-предшественник)	5'-GCT TCT TCT ACA CAC CCA TGT C-3' 5'-AGC ACT GAT CTA CAA TGC CAC-3'	147	60.6 60.1
mAmy	Amylase (амилаза)	5'-AAC GAA AGA GAA ATT GAA ACC-3' 5'-GCC CCC ACT CCA CAC ATG TGG-3'	213	60.0 62.0

пользовали DNA Ladder («Promega») с шагом 1 т.п.н. и 100 п.н. Наносили по 6 мкл пробы, полученной после ОТ-ПЦР, на лунку. Гель анализировали в ультрафиолете (360 нм) после окрашивания бромистым этидием («Sigma»).

### Количественная ПЦР

Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с помощью набора для ПЦР-РВ с красителем EVA Green («Синтол») на приборе CFX96 («BioRad»). Условия реакции: предварительная инкубация при 95°C в течение 5 мин для активации ДНК-полимеразы, затем 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 57–59°C, 30 с; элонгация – 72°C, 45 с. Температура отжига слегка варьировала для разных генов в соответствии с температурой плавления праймеров (табл. 3). Флуоресценцию определяли в канале Fam, первичную обработку результатов осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения, поставляемого с прибором. В качестве внутреннего стандарта, относительно которого вычисляли концентрацию всех остальных мРНК, использовали мРНК GAPDH. Образцы кДНК каждого изучаемого гена анализи-

ровали по возможности одновременно и параллельно в соседних лунках прибора, в строго идентичных условиях.

### Определение уровня синтеза мочевины клетками

Уровень синтеза мочевины клетками определяли с помощью набора Urea Assay Kit фирмы «BioVision» по инструкции производителя. Количество мочевины измеряли в среде культивирования, за 24 ч до взятия пробы среду меняли на свежую. Клетки, культивируемые в 2D-условиях, анализировали на первом пассаже, пробы клеток, культивируемых в 3D-условиях, отбирали на 1, 5 и 10-й день инкубации в геле.

### Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили в трех повторах на культурах клеток, полученных от трех разных животных. Каждую процедуру проводили в одинаковых условиях в трех технических повторностях. Статистическую обработку осуществляли по *t*-критерию Стьюдента при уровне доверительной вероятности 95% для биологических повторов и 99% – для технических.

Таблица 3. Праймеры, использованные при проведении ПЦР в реальном времени

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ампли- кон, п.н.	T <sub>пл</sub> , °C
mGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'	95	62.6 62.6
mKRT19	Keratin 19 (кератин 19)	5'-GGG GGT TCA GTA CGC ATT GG-3' 5'-GAG GAC GAG GTC ACG AAG C-3'	113	62.9 62.1
mAFP	Alpha fetoprotein (α-фетопротеин)	5'-CCA TCA CCT TTA CCC AGT TTG T-3' 5'-CCC ATC GCC AGA GTT TTT CTT-3'	101	60.2 60.6
m1AAT	Alpha-1-antitrypsin (α-1-антитрипсин)	5'-CTC GTC CGC TCA CTA AAC AAG-3' 5'-GCT GTC TGA GAG TCA AGG TCT T-3'	248	60.7 61.3
mTAT	Tyrosine aminotransferase (тирозин-аминотрансфераза)	5'-AGC CGA ATC CGA ACA AAA CC-3' 5'-GCC GAT AGA TGG GGC ATA GC-3'	146	60.9 61.3
mPEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (фосфоенолпируват-карбоксикиназа 1)	5'-TGA CAG ACT CGC CCT ATG TG-3' 5'-CCC AGT TGT TGA CCA AAG GC-3'	153	61.0 61.4

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Морфологическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мыши, культивируемых в 2D- и 3D-условиях

После выделения ППКП прикреплялись к покрытому коллагеном типа I пластику на 1–2 день; ПКСЖ – на 2–3 день. Клетки были полигональными, одноядерными, имели небольшой размер и высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Затем происходило формирование плотных колоний. Монослой ПКСЖ формировался на 5 день, ППКП – на 7 день (рис. 1А,Б). На данном этапе клетки, полученные из печени и слюнной железы, визуально практически не отличались. Время удвоения клеточной популяции было максимальным на нулевом пассаже – около 35 ч для ПКСЖ и 50 ч для ППКП. После образования монослоя и при дальнейшем культивировании время удвоения клеточной популяции стабилизировалось, составляя примерно 42 ч у ПКСЖ и 63 ч у ППКП. Обе культуры клеток были способны проходить более 20 пассажей, что свидетельствует о том, что они имеют высокий пролиферативный потенциал и состоят в основном из малодифференцированных клеток.

На первом пассаже ПКСЖ и ППКП были заключены в 4% коллагеновый гель в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл геля. Морфологические изменения наблюдали в течение последующих 10 дней инкубации клеток в геле. ПКСЖ приобретали вытянутую форму, образовывали скопления, которые со временем увеличивались в размерах. От скоплений отходили тяжи, состоящие из нескольких десятков клеток (рис. 1В). На парафиновых срезах видно, что тяжи клеток ПКСЖ в геле имеют тубулярную структуру (рис. 1Д). ППКП также образуют скопления в виде небольших тяжей, однако появление крупных скоплений менее выражено (рис. 1Г). На срезах видно,

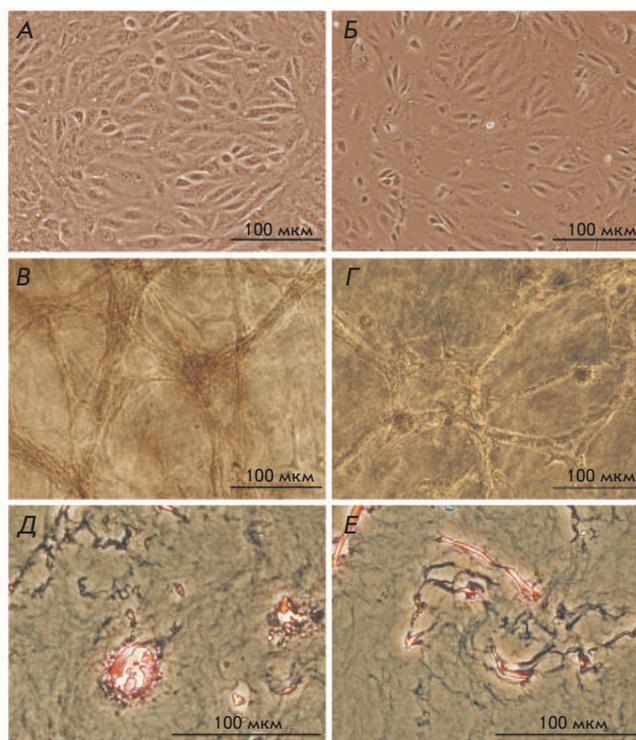
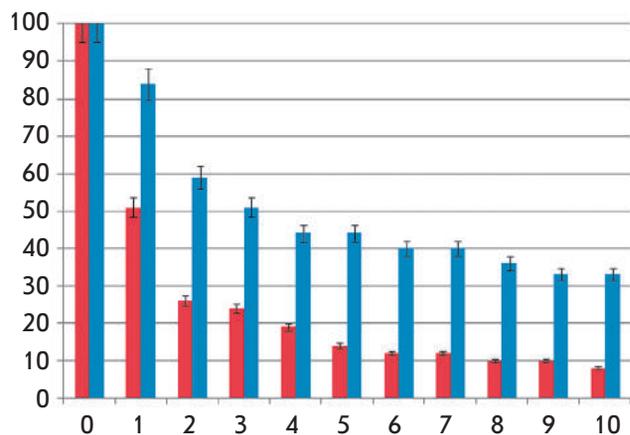


Рис. 1. Морфология клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования, фазовый контраст. А – ПКСЖ – монослойная культура, 0 пассаж; Б – ППКП – монослойная культура, 0 пассаж; В – ПКСЖ – 10-й день культивирования в 4% коллагеновом геле, 1 пассаж; Г – ППКП – 10-й день культивирования в 4% коллагеновом геле, 1 пассаж; Д – ПКСЖ, гистологический срез коллагенового геля, 10-й день культивирования, окраска азур-эозином; Е – ППКП, гистологический срез коллагенового геля, 10-й день культивирования, окраска азур-эозином



**Рис. 2.** Контракция 4% коллагенового геля клетками печени и слюнной железы мыши. Концентрация клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл геля, 1 пассаж. По оси X – время контракции (дни), по оси Y – площадь геля по отношению к первоначальной площади в %. Красным выделены столбики, относящиеся к ПКСЖ, синим – к ППКП

что эти структуры не являются полыми (рис. 1Е). Часть ППКП в 3D-условиях остаются округлыми, увеличиваются в размерах и содержат множество гранул.

По мере разрастания клеточных тяжей происходит уменьшение размеров коллагенового геля (контракция). Известно, что степень контракции геля зависит от цитоскелета клеток и отражает их сократительные способности [19]. Изучаемые клетки приобретают сократительные способности при дифференцировке в миоэпителий. Таким образом, по степени контракции коллагенового геля можно судить о потенциале дифференцировки ПКСЖ и ППКП в миоэпителиальном направлении.

В течение всего периода инкубации ПКСЖ и ППКП в 3D-условиях наблюдается контракция коллагенового геля. ПКСЖ вызывают значительную контракцию, уже после 5 дней инкубации клеток в геле его площадь сокращается до 14% от первоначальной (рис. 2). В то же время ППКП контрактируют гель в меньшей степени, к 10-му дню инкубации площадь геля составляет более 30% от первоначальной (рис. 2). Таким образом, у ПКСЖ более выражена способность к дифференцировке в миоэпителиальном направлении, что согласуется с опубликованными данными [24].

Полученные нами данные говорят о сходстве морфологических характеристик ПКСЖ и ППКП при культивировании в 2D-условиях. Однако в 3D-условиях морфогенетические свойства клеток значительно различаются.

### Иммуноцитохимическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мышцы в 2D-условиях и после культивирования в коллагеновом геле

Для определения влияния 3D-условий культивирования на экспрессию гепатоцитарных маркеров провели иммунофенотипирование ПКСЖ и ППКП, культивированных на пластике и после 10 дней инкубации в коллагеновом геле. Иммунофенотипирование энтодермальных клеток проводили на первом пассаже с использованием маркеров, указанных в табл. 1.

Клетки обеих культур при культивировании в 2D-условиях являются слабо позитивными по альбумину и характерному для клеток печени цитохрому P450 1A1 (рис. 3А,Б,Г,Д). Для обеих культур характерно окрашивание на цитокератин 19 (рис. 3В,Е), однако локализация цитокератина в ПКСЖ и ППКП различается. В ПКСЖ цитокератин 19 находится в перинуклеарном пространстве, а также под плазматической мембраной, что, по всей видимости, связано с развитой системой плотных контактов в этих клетках в связи с выполняемой ими барьерной функцией. В ППКП цитокератин 19 локализуется в основном в перинуклеарном пространстве. В обеих культурах присутствует небольшое число клеток, в которых цитокератин 19 распределен по всей цитоплазме.

При анализе клеток, культивируемых в течение 10 дней в 3D-условиях, гель растворяли коллагеназой типа II, клетки высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях ( $CO_2$ -инкубатор, 48 ч), а затем проводили иммунофенотипирование клеток. После культивирования в коллагеновом геле, в ПКСЖ повысился уровень экспрессии цитохрома P450 1A1 (рис. 3З), уровень экспрессии альбумина не изменился. Экспрессия цитокератина 19 снизилась, изменилась его локализация: в большей части клеток цитокератин 19 находился в перинуклеарном пространстве (рис. 3И). После инкубации в коллагеновом геле в ППКП повысилась экспрессия альбумина и цитохрома P450, снизилась экспрессия цитокератина 19 (рис. 3К–М).

Таким образом, изучаемые культуры клеток характеризуются сходной экспрессией гепатоцитарных маркеров при культивировании в 2D-условиях. Данные иммуноцитохимического анализа свидетельствуют о том, что маркеры гепатоцитов экспрессируются в обеих культурах. Однако в изучаемых энтодермальных клетках уровень их экспрессии низок, что может говорить о том, что ПКСЖ и ППКП находятся в малодифференцированном состоянии. Как ПКСЖ, так и ППКП экспрессируют маркеры, характерные для протокового (цитокератин 19) и гепатоцитарного (альбумин, цитохром P450 1A1) направления дифференцировки, т.е. обладают бипотентным потенциа-

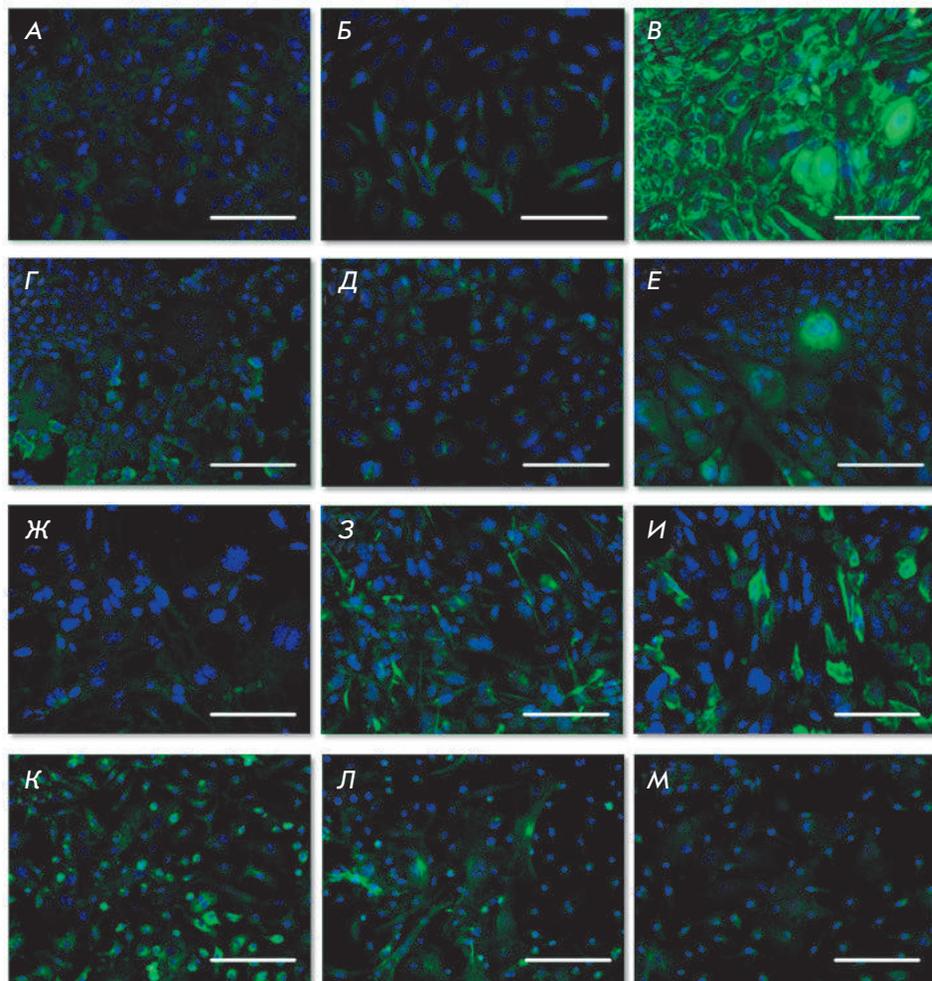


Рис. 3. Иммуноцитохимическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мыши на 1 пассаже, флуоресцентная микроскопия. Синим окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым – соответствующие антигены (Alexa Fluor 488), длина мерного отрезка – 100 мкм. А – ПКСЖ, альбумин, 2D-условия; Б – ПКСЖ, цитохром P450 1A1, 2D-условия; В – ПКСЖ, цитокератин 19, 2D-условия; Г – ППКП, альбумин, 2D-условия; Д – ППКП, цитохром P450 1A1, 2D-условия; Е – ППКП, цитокератин 19, 2D-условия; Ж – ПКСЖ, альбумин, после 10 дней инкубации в геле; З – ПКСЖ, цитохром P450 1A1, после 10 дней инкубации в геле; И – ПКСЖ, цитокератин 19, после 10 дней инкубации в геле; К – ППКП, альбумин, после 10 дней инкубации в геле; Л – ППКП, цитохром P450 1A1, после 10 дней инкубации в геле; М – ППКП, цитокератин 19, после 10 дней инкубации в геле

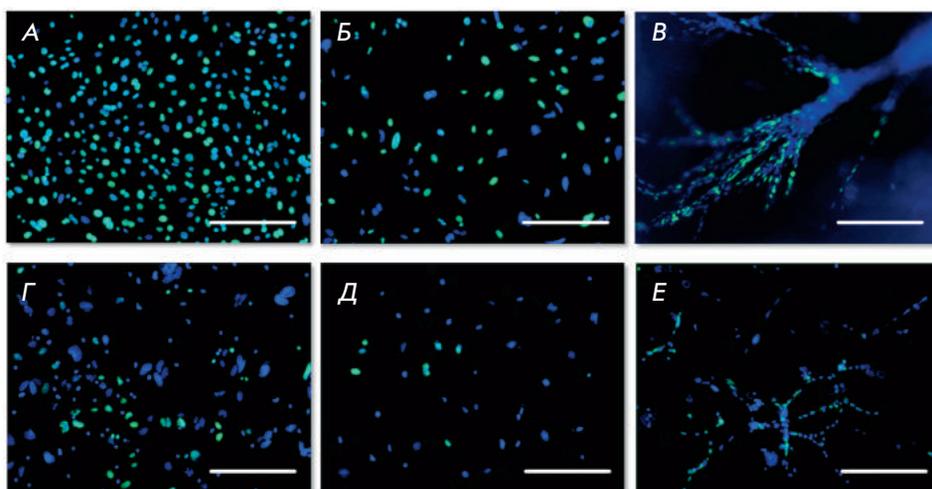
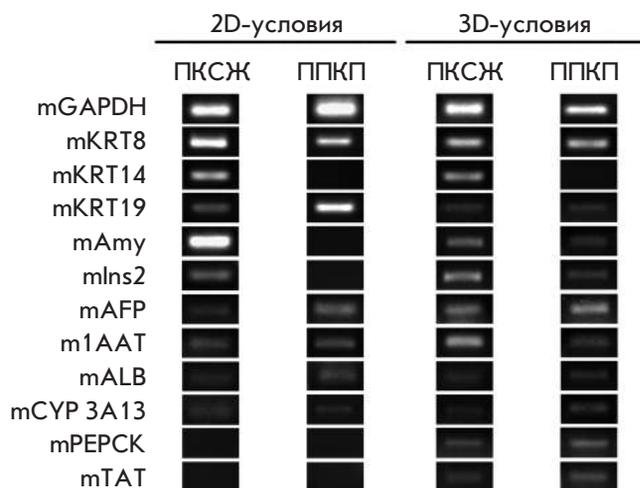


Рис. 4. Анализ пролиферативной активности культур клеток печени и слюнной железы мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования, 1 пассаж, флуоресцентная микроскопия. Синим окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым – BrdU (Alexa Fluor 488), длина мерного отрезка – 100 мкм. А – ПКСЖ, 2D-условия; Б – ПКСЖ, клетки, выделенные из геля после 10 дней инкубации; В – ПКСЖ, 10 дней инкубации в 3D-условиях (без выделения из геля); Г – ППКП, 2D-условия; Д – ППКП, клетки, выделенные из геля после 10 дней инкубации; Е – ППКП, 10 дней инкубации в 3D-условиях (без выделения из геля)



**Рис. 5.** ОТ-ПЦР-анализ культур клеток печени и слюнной железы мыши на 1 пассаже в 2D- и 3D-условиях культивирования

лом дифференцировки, что характерно, например, для овальных клеток [25]. После культивирования в 3D-условиях в клетках возрастает экспрессия маркеров, характерных для гепатоцитарного направления, причем в ППКП это выражено сильнее. Экспрессия маркеров протокового направления (цитokerатин 19) снижается в обеих культурах.

**Определение пролиферативной активности клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях**

Анализ пролиферативной активности клеток при помощи определения включения BrdU выявил высокий пролиферативный потенциал ПКСЖ. На первом пассаже при культивировании в 2D-условиях BrdU включали более 90% клеток слюнной железы (рис. 4А) и 30% ППКП (рис. 4Г). По-видимому, популяция ППКП более гетерогенна и содержит клетки с различной степенью дифференцировки.

На 10-й день культивирования в коллагеновом геле BrdU включался только в 52% ПКСЖ и 11.6% ППКП (рис. 4Б,Д). Таким образом, в 3D-условиях клеточная пролиферация обеих культур замедляется примерно в 2 раза. Для выяснения особенностей роста клеток в геле и выявления закономерностей морфогенеза в 3D-условиях провели окрашивание на BrdU без выделения клеток из геля. В результате не выявили каких-либо закономерностей в распределении пролиферирующих клеток: позитивные по BrdU клетки располагались как в наружных, так и во внутренних слоях по всей длине клеточных тяжей (рис. 4В,Е).

**ОТ-ПЦР для культур клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования**

ОТ-ПЦР-анализ ПКСЖ и ППКП был проведен на первом пассаже в 2D-условиях культивирования, а также в 3D-условиях после 10 дней инкубации клеток в геле. ОТ-ПЦР проводили по широкому набору маркеров, характерных для клеток энтодермы. В качестве положительного контроля ПЦР использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

По данным ОТ-ПЦР ПКСЖ, как и ППКП, на первом пассаже в 2D-условиях экспрессируют цитокератины 8, 18, 19, характерные для эпителиальных клеток энтодермы. ПКСЖ, кроме этого, экспрессируют цитокератин 14, характерный для клеток, ассоциированных с базальной мембраной, а также амилазу и инсулин (рис. 5), ППКП являются отрицательными по этим маркерам. Что касается маркеров, характерных для гепатоцитов, то в ПКСЖ и ППКП экспрессируются α-фетопроtein, α-1-антитрипсин, альбумин и характерный для гепатоцитов цитохром P450 3A13. Маркеры, характерные для поздних стадий дифференцировки гепатоцитов (*PEPCK*, *TAT*), в 2D-условиях культивирования не обнаруживаются.

После 10 дней культивирования в коллагеновом геле в ПКСЖ и ППКП выявляется экспрессия *PEPCK* и *TAT*, что характерно для поздних стадий дифференцировки клеток печени. В ППКП, кроме того, наблюдается экспрессия амилазы и инсулина, маркеров клеток панкреатического направления. Подобная фенотипическая пластичность прогениторных клеток печени согласуется с опубликованными данными, согласно которым стволовые клетки печени и поджелудочной железы могут трансдифференцироваться друг в друга при определенных условиях культивирования *in vitro* [2, 26].

**Количественная ПЦР с детекцией в реальном времени для культур клеток слюнной железы в сравнении с прогениторными клетками печени в 2D- и 3D-условиях культивирования**

Сравнительный анализ культур клеток ПКСЖ и ППКП проводили методом количественной ПЦР с детекцией в реальном времени на первом пассаже по маркерам, характерным для клеток печени (табл. 4). Помимо этого проанализировали экспрессию этих генов в ПКСЖ после 10 дней культивирования в коллагеновом геле. Данные для каждой культуры нормировали по гену *GAPDH*, уровень экспрессии которого принят за 1.

ПКСЖ на первом пассаже в 2D-условиях экспрессируют цитокератин 19 на довольно высоком уровне, но в ППКП его экспрессия более чем в 18 раз выше.

Таблица 4. ПЦР-РВ для ПКСЖ и ППКП на первом пассаже в 2D- и 3D-условиях культивирования\*

Праймер	2D-условия		3D-условия, 10-й день
	ПКСЖ	ППКП	ПКСЖ
mGAPDH	1	1	1
mKRT19	14.1	295.59	7.9
mAFP	0.01	0.12	1.19
m1AAT	0.04	0.30	3.19
mTAT	0.09	0.43	0.32
mPEPCK	0.02	0.08	0.18

\*Данные нормированы по GAPDH.

После инкубации в геле экспрессия цитокератина 19 в клетках слюнной железы снижается примерно в 2 раза. Экспрессия  $\alpha$ -фетопротеина, характерного для овальных клеток, в обеих культурах довольно низкая, но в ППКП его экспрессия выше примерно в 10 раз. Гепатоцитарные маркеры экспрессируются в изучаемых клетках на относительно низком уровне, причем в ППКП экспрессия этих маркеров в несколько раз выше. После 10 дней инкубации в геле экспрессия  $\alpha$ -фетопротеина в ПКСЖ возрастает более чем в 100 раз и значительно превышает уровень экспрессии в ППКП в 2D-условиях культивирования. Экспрессия  $\alpha$ -1-антитрипсина, характерного для начальных этапов гепатоцитарной дифференцировки, возрастает в 3D-условиях в ПКСЖ почти в 80 раз. Экспрессия маркеров поздних стадий гепатоцитарной дифференцировки также значительно увеличивается.

#### Определение уровня синтеза мочевины клетками слюнной железы и прогениторными клетками печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования

Для определения функциональной активности изучаемых клеток проведен анализ уровня синтеза мочевины ПКСЖ и ППКП в 2D- и 3D-условиях культивирования.

В 2D-условиях обе культуры энтодермальных клеток практически не синтезируют мочевину: на первом пассаже – около 2 мМ мочевины на  $1 \times 10^6$  клеток ПКСЖ за 24 ч, ППКП – около 2.5 мМ (рис. 6). Этот показатель несколько снижается при увеличении числа пассажей (данные не представлены). Однако при культивировании в 3D-условиях синтез мочевины постепенно увеличивается как в ППКП, так и в ПКСЖ. В 10-му дню культивирования уровень синтеза мочевины увеличился почти в 15 раз

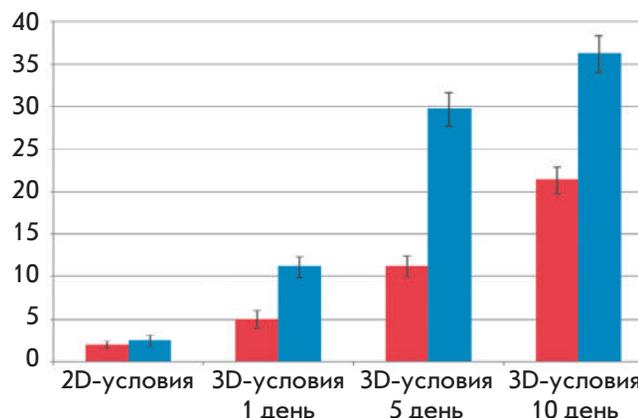


Рис. 6. Синтез мочевины культурами клеток печени и слюнной железы мыши при культивировании в 2D- и 3D-условиях, 1 пассаж. По оси Y – количество мочевины (мМ) в пересчете на  $1 \times 10^6$  клеток за 24 ч. Красным выделены столбики, относящиеся к ПКСЖ, синим – к ППКП

в ППКП и в 10 раз в ПКСЖ. Таким образом, к 10-му дню культивирования в 3D-условиях уровень синтеза мочевины в ПКСЖ составил около 60% от уровня в ППКП.

Известно, что стволовые клетки печени и поджелудочной железы способны к трансдифференцировке в пределах энтодермального зародышевого листка. Так, при пересадке протоковых клеток поджелудочной железы в печень они дифференцируются в гепатоциты [27]. Овальные клетки могут дифференцироваться в эндокринные и экзокринные клетки поджелудочной железы [26]. В культуре при увеличении плотности посева островковые клетки могут дифференцироваться в гепатоциты. Показано, что при воздействии дексаметазона ацинарные клетки поджелудочной железы могут дифференцироваться в гепатоциты [2]. Однако информация о дифференцировочных потенциях клеток слюнной железы все еще немногочисленна. При стимуляции культуры клеток слюнной железы свиньи никотиномидом экспрессия альбумина в них возрастает в 5 раз [18]. Клетки слюнной железы мыши, введенные в печень через портальную вену, способны интегрироваться в печень и синтезировать альбумин и  $\alpha$ -1-антитрипсин [16].

В целом полученные нами результаты подтверждают высокую фенотипическую пластичность клеток слюнной железы мыши в пределах энтодермального зародышевого листка. ПКСЖ в значительной степени и специфично подвергаются гепатоцитарной дифференцировке в коллагеновом геле без дополнительной стимуляции факторами роста и цитокинами.

## ВЫВОДЫ

Нами получена культура постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы мыши и проведено ее сравнение с постнатальными прогениторными клетками печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования.

Постнатальные клетки слюнной железы и прогениторные клетки печени мыши – это энтодермальные эпителиальные клетки. ПКСЖ являются протоковыми клетками с высоким пролиферативным потенциалом. Популяция ППКП гетерогенна и содержит в своем составе клетки на разных стадиях дифференцировки. Обе культуры обладают бипотентным потенциалом дифференцировки в гепатоцитарном и протоковом направлениях. ПКСЖ, кроме того, способны к дифференцировке в панкреатическом направлении, а ППКП приобретают такую способность при культивировании в коллагеновом геле.

По экспрессии различных клеточных маркеров ПКСЖ и ППКП проявляют значительное сходство и, по всей видимости, имеют сходные дифференцировочные потенции. В целом ПКСЖ и ППКП обладают значительной фенотипической пластичностью и способностью к трансдифференцировке в пределах энтодермального зародышевого листка.

В 3D-условиях культивирования ПКСЖ и ППКП подвергаются дифференцировке, о чем свидетельствуют замедление клеточной пролиферации и повышение уровня экспрессии маркеров дифференцировки. Для ПКСЖ в 3D-условиях характерны снижение экспрессии маркеров протокового направления и увеличение экспрессии маркеров гепатоцитарного направления в сравнимой с ППКП степени.

Культивирование клеток в коллагеновом геле является удобной моделью *in vitro*-анализа дифференцировочного потенциала клеток. Постнатальные клетки слюнной железы при культивировании в коллагеновом геле подвергаются дифференцировке в гепатоцитарном направлении без дополнительной стимуляции цитокинами и факторами роста. Таким образом, полученные постнатальные клетки слюнной железы перспективны для трансдифференцировки в гепатоцитарном направлении и могут стать удобным источником клеток для заместительной клеточной терапии заболеваний печени. ●

Работа поддержана РФФИ  
(проект № 11-04-12061-офи-М-2011).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Урываева И.В. Стволовые клетки в регенерации печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Изд-во Медицина, 2009. Т. 2. 456 с.
- Zaret K.S. // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. P. 329–340.
- Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. // Cell Transplant. 2003. V. 12. № 1. P. 1–11.
- Hay D.C., Fletcher J., Payne C., Terrace J.D., Gallagher R.C., Snoeys J., Black J.R., Wojtacha D., Samuel K., Hannoun Z., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 26. № 105. P. 12301–12306.
- Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // Acta Med. Okayama. 2008. V. 62. P. 63–68.
- Mizumoto H., Aoki K., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. // Transplant. Proc. 2008. V. 40. № 2. P. 611–613.
- Snykers S., Vanhaecke T., De Becker A., Papeleu P., Vinken M., van Riet I., Rogiers V. // BMC Dev. Biol. 2007. V. 2. № 7. P. 24.
- De Kock J., Vanhaecke T., Rogiers V., Snykers S. // Aatex. 2008. V. 14. P. 605–611.
- Гумерова А.А., Шафигуллина А.К., Трондин А.А., Газизов И.М., Андреева Д.И., Калигин М.С., Ризванов А.А., Киясов А.П. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 4. С. 72–81.
- Sgodda M., Aurich H., Kleist S., Aurich I., Konig S., Dollinger M.M., Fleig W.E., Christ B. // Exp. Cell Res. 2007. V. 313. P. 2875–2886.
- Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. P. 258–264.
- Stock P., Staeger M.S., Muller L.P., Sgodda M., Volker A., Volkmer I., Lutzkendorf J., Christ B. // Transplant. Proc. 2008. V. 40. P. 620–623.
- Dawn M.D., De Coppi P., Bartsch G., Atala A. // Meth. Enzymology. 2006. V. 419. P. 426–438.
- Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. // Cell Biol. Internat. 2008. V. 32. № 11. P. 1439–1448.
- Гвазава И.Г., Васильев А.В., Балан О.В., Терских В.В. // Цитология. 2011. Т. 53. № 2. С. 129–134.
- Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Sato A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // Hepatology. 2004. V. 39. P. 667–675.
- Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // Cloning Stem. Cells. 2007. V. 9. P. 191–205.
- Matsumoto S., Okumura K., Ogata A., Hisatomi Y., Sato A., Hattori K., Matsumoto M., Kaji Y., Takahashi M., Yamamoto T., et al. // Cloning Stem. Cells. 2007. V. 9. P. 176–190.
- Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Брагина Е.Е., Терских В.В., Васильев А.В. // Цитология. 2011. Т. 53. № 4. С. 325–331.
- Шинин В.В., Черная О.Г., Терских В.В. // Онтогенез. 2002. Т. 33. № 3. С. 176–181.
- Воротеляк Е.А., Леонова О.Г., Шинин В.В., Васильев А.В., Терских В.В. // Докл. АН. 1999. Т. 369. № 5. С. 695–697.
- Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Gnedeva K.Y., Moldaver M.V., Yegorov Y.E., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 133. P. 567–576.
- Zhang Y., Jalili R.B., Warnock G.L., Ao Z., Marzban L., Ghahary A. // Am. J. Pathol. 2012. V. 181. № 4. P. 1296–1305.
- Бабаева А.Г., Шубникова Е.А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: Изд-во МГУ, 1979. 192 с.
- Duncan A.W., Dorrell C., Grompe M. // Gastroenterology. 2009. V. 137. № 2. P. 466–481.
- Reddy J.K., Rao M.S., Yeldandi A.V., Tan X.D., Dwivedi R.S. // Digestive Diseases Sci. 1991. V. 36. № 4. P. 502–509.
- Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.R., Hurston E., Novikoff P.M., Hixson D.C., Gupta S., Shafritz D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 8. № 94. P. 7356–7361.

УДК 577.29

# N-Концевые партнеры для эффективной продукции рецепторов, сопряженных с G-белками, в бактериальных бесклеточных системах

Е. Н. Люкманова<sup>1</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1</sup>, Н. Ф. Хабибуллина<sup>1,2</sup>, Д. С. Кульбацкий<sup>1</sup>,  
М. А. Шулепко<sup>1,2</sup>, Л. Е. Петровская<sup>1</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.08.2012

**РЕФЕРАТ** Семейство рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), – одно из наиболее многочисленных семейств мембранных белков человека. Эти рецепторы, несмотря на их огромную важность для новых разработок в области фармакологии и медицины, остаются малоизученными. Основной фактор, сдерживающий структурно-функциональные исследования GPCR, – отсутствие высокоэффективных систем гетерологической продукции. Бесклеточные белоксинтезирующие системы, основанные на экстрактах из клеток *Escherichia coli*, в последнее время привлекают большое внимание в качестве эффективной альтернативы клеточным системам продукции рекомбинантных мембранных белков. Продукция GPCR в бактериальных бесклеточных системах затруднена из-за проблем, связанных с низкой эффективностью процесса инициации трансляции. Выход рецепторов может быть увеличен путем экспрессии слитых конструкций, содержащих дополнительные N-концевые аминокислотные последовательности-партнеры. В представленной работе для увеличения эффективности бесклеточного синтеза  $\beta$ 2-адренорецептора, мускаринового M1 холинорецептора и соматостатинового рецептора типа 5 человека предложены три новые N-концевые последовательности. Показано, что использование N-концевого фрагмента (6 а.о.) бактериородопсина грамположительной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR-tag), N-концевого фрагмента (16 а.о.) рибонуклеазы A (S-tag) и белка Mistic из *Bacillus subtilis* позволяет увеличить выход GPCR в 5–38 раз и получить 0.6–3.8 мг целевого белка из 1 мл реакционной смеси, что достаточно для структурно-функциональных исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бесклеточные системы синтеза, рецепторы, сопряженные с G-белками, инициация трансляции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** а.о. – аминокислотный остаток; ББС – бесклеточная белоксинтезирующая система; МБ – мембранный белок; РС – реакционная смесь; ПС – питающая смесь; ТМ – трансмембранный;  $\beta$ 2AR –  $\beta$ 2-адренергический рецептор человека; ESR – бактериородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*; ESR-tag – N-концевой фрагмент (6 а.о.) ESR; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками; M1-mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор человека типа M1; SSTR5 – соматостатиновый рецептор человека типа 5; S-tag – N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы A; T7-tag – N-концевой фрагмент (11 а.о.) лидерной последовательности белка 10 бактериофага T7; TRX – тиоредоксин из *Escherichia coli*.

## ВВЕДЕНИЕ

Интегральные мембранные белки (МБ) участвуют во многих процессах, необходимых для жизни отдельных клеток и многоклеточных организмов. Эти белки ответственны за клеточную энергетику, межклеточное узнавание, а также за процессы проведения сигналов и транспорта различных веществ через

клеточную мембрану [1]. Согласно современным данным, МБ составляют более 25% всех аминокислотных последовательностей, закодированных в геноме высших организмов, включая человека [2]. Один из фармакологически наиболее важных классов МБ – рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR). В геноме человека идентифицировано более 800 генов, коди-

рующих рецепторы этого семейства [3]. Именно мембранные рецепторы этого класса служат мишенями для ~30% современных лекарственных средств [4]. Рецепторы семейства GPCR имеют гомологичную пространственную организацию, они содержат семь трансмембранных (ТМ) спиралей, а также внеклеточный N-концевой и внутриклеточный C-концевой участки [5]. Сайты связывания низкомолекулярных соединений (лигандов) во многих случаях локализованы в ТМ-домене рецептора, в то время как пептидные гормоны и регуляторы белковой природы взаимодействуют с N-концевым участком и внеклеточными петлями [5].

GPCR представляют исключительный интерес для новых разработок в области фармакологии, однако их структурно-функциональные исследования значительно затруднены [5], что во многом связано с невозможностью выделения достаточных количеств белковых препаратов из природных источников, а также с трудностями, возникающими при создании высокоэффективных систем гетерологической продукции этих МБ [6]. В течение последнего десятилетия совместное использование систем экспрессии, основанных на эукариотических клетках, и новых методов рентгеноструктурного анализа позволило определить пространственные структуры ряда рецепторов семейства GPCR [5], включая  $\beta$ 2-адренорецептор ( $\beta$ 2AR) [7] и мускариновые холинорецепторы М2 и М3 (mAChR) человека [8, 9]. Эти работы позволили значительно продвинуться в понимании принципов пространственной организации GPCR, однако для детального исследования функциональной динамики и механизмов работы мембранных рецепторов требуется применение спектроскопических методов высокого разрешения, таких, как гетероядерная ЯМР-спектроскопия [10]. Для применения современных методов ЯМР-спектроскопии необходимо иметь миллиграммовые количества белкового препарата, меченного стабильными изотопами ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) [10], что при использовании эукариотических систем сопряжено со значительными финансовыми затратами. В то же время применение традиционных бактериальных систем экспрессии для продукции GPCR зачастую не позволяет добиться высоких выходов целевого белка и осложнено необходимостью разработки протоколов ренатурации [11].

В последнее время бесклеточные белоксинтезирующие системы (ББС) [12] и особенно системы, основанные на бактериальных экстрактах, приобретают все большую популярность в качестве альтернативного инструмента для рекомбинантной продукции МБ [13]. По сравнению с системами, основанными на клеточной продукции, ББС обладают рядом пре-

имуществ. Среди них можно выделить продукцию исключительно целевого белка, возможность синтеза токсичных белков, простую процедуру синтеза селективно изотопно-меченных препаратов, а также возможность прямого внесения в реакционную смесь (РС) различных агентов и кофакторов, способствующих стабилизации нативной пространственной структуры синтезированного белка в растворе [12, 13]. Например, для продукции МБ в растворимой форме в РС могут добавляться компоненты мембраномоделирующих сред, такие, как мицеллы детергентов, липид-детергентные бицеллы, липосомы и липид-белковые нанодиски [13–15].

Согласно опубликованным данным, прямая экспрессия генов GPCR в ББС малоэффективна [14, 16–18]. Одной из возможных причин считается низкая эффективность процесса инициации трансляции [18], вызванная образованием вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК [19, 20]. Введение на 5'-конец гена целевого белка дополнительных нуклеотидных последовательностей, кодирующих N-концевые полипептидные партнеры, такие, как фрагмент лидерной последовательности белка 10 бактериофага T7 (T7-tag, 11 аминокислотных остатков, а.о., здесь и далее длина последовательности указана с учетом N-концевого остатка Met) [14, 16], белок тиоредоксин *Escherichia coli* (TRX) [17] или синтетические последовательности длиной 1–6 а.о. [18], во многих случаях позволяет решить эту проблему и добиться необходимого уровня продукции GPCR.

В представленной работе для увеличения эффективности бесклеточной продукции GPCR человека на примере  $\beta$ 2AR, M1-mAChR и соматостатинового рецептора типа 5 (SSTR5) предложены три новых N-концевых партнера. Показано, что использование нуклеотидных последовательностей, кодирующих N-концевой фрагмент (6 а.о.) бактериородопсина грамположительной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR-tag), N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы А (N-концевой фрагмент S-пептида, S-tag) и белок *Mistic Bacillus subtilis*, позволяет увеличить выход рецепторов в 5–38 раз, обеспечивая продукцию целевых белков на уровне, достаточном для дальнейших структурно-функциональных исследований.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Дизайн и клонирование генов GPCR с дополнительными 5'-концевыми последовательностями

В работе использованы укороченные гены рецепторов  $\beta$ 2AR, M1-mAChR и SSTR5 человека, содержащие дополнительные замены, и 3'-концевые последо-

вательности, кодирующие 10 остатков His (His<sub>10</sub>-tag) (см. «Результаты и обсуждение»). Молекулярные массы целевых белков составляли 38.2, 32.6 и 32.7 кДа соответственно. Нуклеотидные последовательности, кодирующие T7-tag (11 а.о., MASMTGGQQMG), S-tag (16 а.о., MKETAАAKFERQHMDS), TRX (11.8 кДа) и белок Mistic (12.8 кДа), были введены в одной рамке считывания на 5'-конец укороченных генов GPCR (рис. 1) с использованием стандартных методов генной инженерии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ESR-tag (6 а.о., MEEVNL), была добавлена при помощи одностадийной ПЦР на 5'-конец укороченных генов GPCR взамен участков, кодирующих N-концевые внеклеточные фрагменты рецепторов (см. «Результаты и обсуждение»). Все эти генные конструкции были клонированы в вектор pET22b(+) («Novagen», США) под контроль T7-промотора. Полученные векторы назвали pET22b(+)/GPCR, pET22b(+)/T7-tag-GPCR, pET22b(+)/S-tag-GPCR, pET22b(+)/TRX-GPCR, pET22b(+)/Mistic-GPCR и pET22b(+)/ESR-GPCR (рис. 1).

### Бесклеточная продукция GPCR

GPCR синтезировали в бесклеточной системе диализного типа на основе S30 экстракта из *E. coli*, используя протоколы [15, 21]. Конечная концентрация компонентов РС составляла: 100 мМ HEPES-КОН («Fluka», США), pH 8.0, 8 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 90 мМ KOAc, 20 мМ ацетилфосфат калия («Sigma», США), 20 мМ фосфоенолпируват калия («Aldrich», США), набор аминокислот (по 1.3 мМ каждой), за исключением Arg, Cys, Met, Trp, Asp, Glu, концентрация каждой из которых составляла 1 мМ, 0.15 мг/мл фолиевой кислоты («Sigma»), каждый из четырех рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ, ингибитор протеиназ (X1 Complete protease inhibitor®, «Roche Diagnostics», Германия), 0.05% NaN<sub>3</sub>, 2% полиэтиленгликоль 8000 («Sigma»); 0.3 ед./мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock («Fermentas», Литва), 0.04 мг/мл пируваткиназы («Fermentas», Литва), 5.5 мкг/мл T7-полимеразы, 0.3 мг/мл плазмидной ДНК, 0.5 мг/мл суммарной тРНК (из *E. coli* MRE 600) («Roche Diagnostics», Швейцария), 30% от общего объема РС экстракта S30 из *E. coli*. Питающая смесь (ПС) имела такой же состав, как и РС, исключая высокомолекулярные компоненты: экстракт S30, плазмиду, ферменты, ингибитор рибонуклеаз. Синтез осуществляли без добавления каких-либо мембраноделирующих сред в РС и ПС. Объем РС составлял 50 мкл, объем ПС – 750 мкл. РС помещали в реактор, отделенный от раствора ПС полупроницаемой целлюлозной мембраной (размер пор 12 кДа, «Sigma», США). Инкубацию проводили в течение 20 ч при 30°C и умеренном перемешивании.

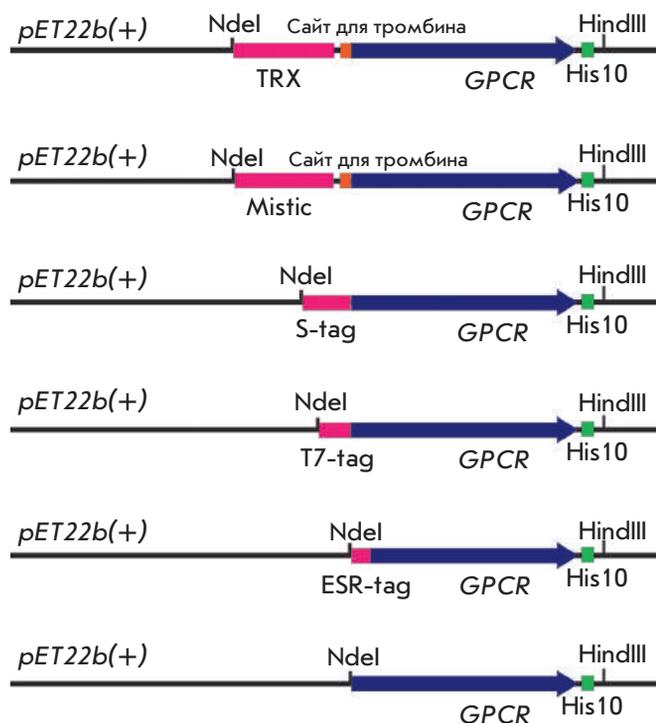
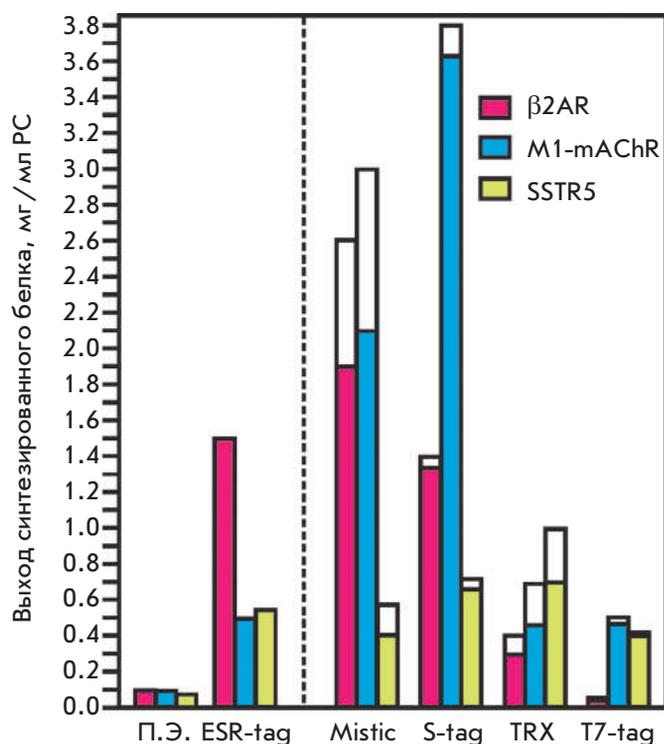


Рис. 1. Дизайн экспрессирующих векторов, содержащих гены GPCR и дополнительные 5'-концевые последовательности. Последовательности, кодирующие N-концевые партнеры, гены GPCR, сайты гидролиза тромбином и полигистидиновые последовательности, показаны розовым, фиолетовым, оранжевым и зеленым соответственно. Показаны сайты эндонуклеаз рестрикции, по которым гены GPCR клонировали в вектор pET22b(+)

### Выделение и очистка препаратов GPCR

РС, содержащие синтезированные GPCR, центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин. Полученные осадки сольбилизировали в буфере А (20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, pH 8.0), содержащем 1% додецилсульфата натрия (SDS), 1 мМ дитиотреитола и 8 М мочевины. Сольбилизированные белки наносили на колонку, содержащую Ni<sup>2+</sup>-сефарозу («GE Healthcare», Швеция), промывали 10 объемами буфера А, содержащего 1% SDS, и элюировали тремя объемами буфера А, содержащего 1% SDS и 500 мМ имидазола. Образцы GPCR диализовали против буфера А, содержащего 1% SDS.

Фракции элюата анализировали при помощи электрофореза в ПААГ и Вестерн-блотинга, используя моноклональные антитела мыши против гексагистидиновой последовательности (His-tag® Monoclonal antibody, «Novagen», США). Количество очищенных препаратов GPCR определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Спектры КД получали



**Рис. 2.** Анализ эффективности бесклеточного синтеза GPCR в зависимости от 5'-концевой последовательности генов. Уровень синтеза GPCR в отсутствие дополнительных 5'-концевых последовательностей обозначен «П.Э.» (прямая экспрессия). Уровень синтеза гибридных белков показан «незаполненными» столбцами, количества синтезированных целевых белков (цветные столбцы) показаны за вычетом доли, занимаемой N-концевыми партнерами. Каждое значение получено на основе усреднения результатов трех повторных опытов, относительная величина стандартного отклонения не превышала 15%. Количественное содержание препаратов GPCR оценивали спектрофотометрически по поглощению при 280 нм после очистки с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии

при комнатной температуре на спектрометре J-810 («Jasco», Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дизайн генов GPCR

Для увеличения стабильности препаратов GPCR и уменьшения тенденции рекомбинантных белков к агрегации использовали укороченные варианты рецепторов, дополнительно содержащие точечные замены. При помощи методов генной инженерии были удалены N- и C-концевые внеклеточные участки, не участвующие в связывании лигандов [7–9, 22–24].

Делеция C-концевых участков рецепторов привела к удалению остатков Cys (241, 435 и 320), которые, как предполагается, являются сайтами посттрансляционного присоединения остатков пальмитиновой кислоты в молекулах β2AR, M1-mAChR и SSTR5 соответственно [7, 23, 24]. Кроме того, из молекулы M1-mAChR был удален фрагмент цитоплазматической петли 3 (L3), которая также не участвует в связывании лигандов [8, 9, 25]. Полученные гены кодировали участки 25–340, 19–224/354–426 и 37–319 рецепторов β2AR, M1-mAChR и SSTR5 человека соответственно. Для последующей очистки рекомбинантных белков с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии на 3'-концевые участки генов дополнительно вводили последовательности, кодирующие His<sub>10</sub>-tag.

Укороченные гены рецепторов β2AR, M1-mAChR и SSTR5 кодировали 10, 9 и 10 остатков Cys соответственно, из которых только остатки из внеклеточной области, возможно, участвуют в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys106–Cys191 и Cys184–Cys190 в β2AR; Cys98–Cys178 и Cys391–Cys394 в M1-mAChR; Cys112–Cys186 в SSTR5, нумерация приведена для нативной последовательности рецепторов). С целью уменьшения агрегации рекомбинантных белков в результате образования «ненативных» межмолекулярных дисульфидных связей, при помощи сайт-направленного мутагенеза заменили остатки Cys, имеющие трансмембранную и цитоплазматическую локализацию. Так, используя данные [26, 27], остатки Cys77, Cys116 и Cys125 в последовательности β2AR были заменены на Val, а остатки Cys285, Cys327 и Cys265 – на Ser. В M1-mAChR остатки Cys69, Cys205, Cys417, Cys421, Cys435 и Cys460 заменили на Ser [28]. В SSTR5 остатки Cys129, Cys237 и Cys260 заменили на Ser; остатки Cys169, Cys218 и Cys220 – на Val; а остатки Cys51 и Cys298 – на Gly. Кроме того, в последовательность β2AR дополнительно внесли «стабилизирующую» замену Glu122Trp [29].

### Экспрессия генов GPCR в бесклеточной системе

Добавление в PC бесклеточной системы мембрано-моделирующих компонентов в некоторых случаях позволяет синтезировать МБ в растворимой и функционально активной форме [13–18]. Однако многие из подобных добавок, например молекулы детергентов, способны негативно влиять на продуктивность системы, частично или полностью ингибируя синтез целевого белка [14–17]. Поэтому в нашей работе для сравнительного анализа эффективности экспрессии генов GPCR с дополнительными 5'-концевыми участками мы не использовали мембрано-моделирующие среды в процессе синтеза. При этом целевые белки накапливались в виде осадка PC. Осадки рас-

творяли в «жестком» детергенте SDS в присутствии мочевины и восстанавливающего агента дитиотреитола. Количество синтезированных белков оценивали спектрофотометрически после очистки растворенных осадков при помощи Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии. Синтез целевых белков подтверждали с использованием моноклональных антител против гексагистидиновой последовательности.

Как и ожидалось, прямая экспрессия укороченных генов *β2AR*, *M1-mAChR* и *SSTR5* в ББС на основе экстракта S30 из *E. coli* была малоэффективна. Выход целевых белков после очистки не превышал 0.1 мг с 1 мл РС (рис. 2). Следует отметить, что ранее мы наблюдали высокоэффективную продукцию (выход до 1.6 мг/мл [15]) бактериородопсина из грамположительной бактерии *Ex. sibiricum* (ESR) – структурного гомолога рецепторов семейства GPCR, также содержащего семь ТМ-спиралей [30]. Мы предположили, что низкий выход модельных GPCR связан с малой эффективностью инициации трансляции, вызванной образованием вторичной структуры фрагментом мРНК в области начала целевого гена. Для подтверждения этого предположения в генах укороченных GPCR заменили 5'-концевые последовательности, кодирующие внеклеточные N-концевые аминокислотные остатки, предшествующие первой ТМ-спирали (остатки 25–33, 19–23 и 37–38 в *β2AR*, *M1-mAChR* и *SSTR5* соответственно), на нуклеотидную последовательность, кодирующую первые 6 а.о. бактериородопсина ESR (ESR-tag, длина последовательности указана с учетом N-концевого остатка Met) (рис. 1). Эта замена позволила значительно увеличить эффективность продукции целевых белков (рис. 2). При этом выход гибридного белка ESR-tag-*β2AR* был сравним с выходом белка ESR, в то время как уровень синтеза двух других гибридных белков – ESR-tag-*M1-mAChR* и ESR-tag-*SSTR5* – был примерно в 3 раза ниже (~ 0.5 мг/мл).

### Сравнение эффективности синтеза GPCR с различными N-концевыми партнерами

Полученные результаты подтвердили важную роль 5'-концевой последовательности гена в эффективной экспрессии в бесклеточной системе. Однако выходы целевых белков, достигнутые с использованием ESR-tag, возможно, не были оптимальными. Так, в литературе описаны примеры синтеза рекомбинантных МБ в ББС диализного типа на основе экстракта S30 клеток *E. coli* с выходом до 4–6 мг/мл [14]. С целью дальнейшей оптимизации системы синтеза модельных GPCR мы опробовали четыре N-концевых партнера. Два из них, T7-tag (11 а.о.) и белок TRX (11.8 кДа), ранее применяли для бесклеточной продукции рецепторов семейства GPCR [14, 16, 17], в то время как белок

Mistic (12.8 кДа) использовали для продукции GPCR в клетках *E. coli* [31, 32]. Кроме того, опробовали последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы А (N-концевой фрагмент S-пептида, S-tag), который применяется для детекции и очистки препаратов рекомбинантных белков при помощи аффинной хроматографии [33], но не использовался ранее в качестве N-концевого партнера для получения рекомбинантных МБ. В отличие от метода, использованного при дизайне гибридных генов с 5'-концевой последовательностью, кодирующей ESR-tag, нуклеотидные последовательности, кодирующие T7-tag, TRX, Mistic и S-tag, были добавлены в единой рамке считывания на 5'-конец генов укороченных вариантов GPCR (рис. 1).

В большинстве случаев использование N-концевых партнеров вело к увеличению выхода модельных рецепторов, причем степень выхода различалась у разных белков. Так, например, использование T7-tag увеличило выход *M1-mAChR* и *SSTR5* до ~ 0.5 мг/мл, в то время как уровень *β2AR* оставался низким и был сравним с выходом, наблюдаемым при прямой экспрессии. Использование TRX также обеспечивало небольшое увеличение эффективности синтеза целевых белков – до ~ 0.3–0.7 мг/мл (здесь и далее приведены количества целевых белков за вычетом доли, занимаемой белками-партнерами, рис. 2). В то же время применение N-концевых партнеров Mistic и S-tag позволило значительно повысить продукцию *β2AR* и *M1-mAChR* (рис. 2). При этом наибольший выход *β2AR* (~ 1.9 мг/мл) наблюдался при использовании белка Mistic, а максимальный выход *M1-mAChR* (~ 3.6 мг/мл) отмечен в случае гибридного белка с последовательностью S-tag (рис. 2). Однако ни одна из использованных последовательностей-партнеров не позволила добиться значительного увеличения уровня продукции *SSTR5*. Выход этого рецептора (0.4–0.7 мг/мл) был близким при использовании разных гибридных конструкций (рис. 2). По-видимому, в случае *SSTR5* инициация трансляции не является единственным фактором, критически важным для эффективности бесклеточного синтеза. Возможно, для увеличения уровня продукции этого рецептора в бактериальной бесклеточной системе требуется дальнейшая оптимизация нуклеотидной последовательности гена, например замена редко встречающихся у *E. coli* вариантов кодонов. Следует отметить, что близкий по величине выход *SSTR5* (~ 0.5 мг/мл) наблюдали ранее в бактериальной ББС диализного типа при использовании гибрида полноразмерного (не укороченного) рецептора с N-концевой последовательностью T7-tag [34].

Как уже отмечалось, увеличение эффективности синтеза белка при использовании дополнительных

N-концевых последовательностей связано, возможно, с уменьшением способности 5'-концевого фрагмента мРНК к образованию вторичной структуры. Для подтверждения этого предположения проведено моделирование вторичной структуры 5'-концевых фрагментов мРНК, использованных нами для продукции GPCR. Моделирование проводили в программе M-fold, позволяющей оценивать свободную энергию образования вторичной структуры РНК [35]. Свободная энергия образования вторичной структуры была рассчитана для фрагментов мРНК, включающих 4 нуклеотида до стартового кодона, стартовый кодон и 34 нуклеотида гена целевого белка или партнера, следующих за стартовым кодоном, как описано в работе [20]. Расчеты показали (таблица), что нативные последовательности укороченных рецепторов способны образовывать стабильные вторичные структуры ( $\Delta G \sim -5.6, -8.2$  и  $-19.3$  ккал/моль для  $\beta 2AR$ , M1-mAChR и SSTR5 соответственно). Использование последовательностей T7-tag и TRX лишь незначительно уменьшало стабильность вторичной структуры 5'-концевого фрагмента мРНК ( $\Delta G \sim -5.5 \dots -7.8$  ккал/моль). В то же время использование N-концевой последовательности бактериородопсина ESR значительно уменьшало стабильность вторичной структуры 5'-концевого фрагмента мРНК  $\beta 2AR$  и M1-mAChR ( $\Delta G \sim -3.1$  и  $-3.5$  ккал/моль соответственно). Наименее стабильные вторичные структуры мРНК получены при использовании последовательностей Mistic и S-tag ( $\Delta G \sim -1.3$  и  $-3.3$  ккал/моль соответственно). Качественная корреляция рассчитанных энергий с уровнем синтеза GPCR косвенно подтверждает важную роль образования вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК в снижении эффективности инициации трансляции и, как следствие, общей эффективности бесклеточного синтеза.

Модификация 5'-концевой области гена целевого белка не единственный метод предотвращения формирования вторичной структуры мРНК и увеличения эффективности инициации трансляции. На эти процессы также могут влиять нуклеотидные последовательности, которые находятся в нетранслируемых 5'-концевых областях этих мРНК. В представленной работе мы использовали генетические конструкции на основе вектора *pET22b(+)* («Novagen»), содержащего последовательность *lac*-оператора между T7-промотором и сайтом связывания рибосомы (RBS). Согласно опубликованным данным, использование векторов *pIVEX* («Roche Applied Science», США), не содержащих *lac*-оператор, может увеличить эффективность прямой экспрессии генов GPCR в бактериальных ББС [34]. Для проверки этого предположения мы протестировали эффективность прямой

Свободная энергия образования вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК ( $\Delta G$ , ккал/моль)

Партнер/GPCR	$\beta 2AR$	M1-mAChR	SSTR5
Прямая экспрессия	-5.6	-8.2	-19.3
ESR-tag	-3.1	-3.5	-6.4
Mistic	-1.3	-1.3	-1.3
S-tag	-3.3	-3.3	-3.3
TRX	-7.8	-7.8	-7.8
T7-tag	-5.5	-7.6	-7.3

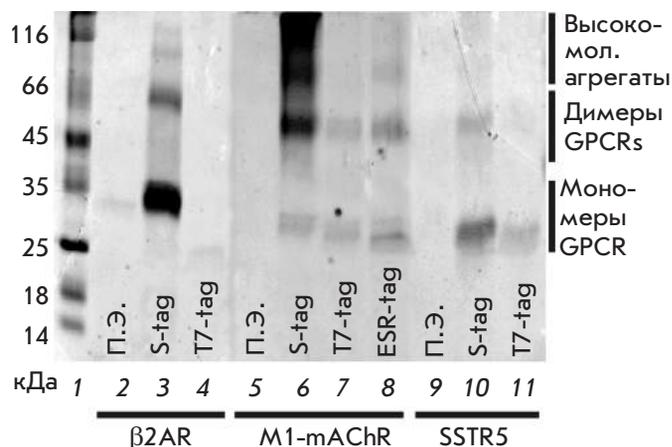
**Примечание.** Свободная энергия рассчитана в программе M-fold [35] для фрагментов мРНК, включающих 4 нуклеотида до стартового кодона, стартовый кодон и 34 нуклеотида гена целевого белка или партнера, следующих за стартовым кодоном.

экспрессии укороченного гена *M1-mAChR* при использовании вектора *pIVEX2.3*. Выход целевого белка в этом случае ( $\sim 0.1$  мг/мл) был не больше, чем при прямой экспрессии гена *M1-mAChR*, клонированного в вектор *pET22b(+)*. Полученные данные согласуются с результатами исследования обонятельных GPCR, продукция которых в бактериальной бесклеточной системе с использованием векторов *pIVEX* была малоэффективной [36]. Кроме того, для высокоэффективной экспрессии клонированных в векторы *pIVEX* генов белков человека также требуется использование N-концевых последовательностей-партнеров [37].

Другим способом решения проблем, связанных с низкой эффективностью инициации трансляции в ББС, может быть рациональный дизайн 5'-концевой последовательности гена целевого белка с использованием синонимичных замен (без изменения кодируемой последовательности), цель которого – уменьшение способности мРНК к формированию вторичной структуры [20]. Так, подобный подход применили для продукции цитокинов млекопитающих в тех случаях, когда наличие последовательности-партнера (N-концевого фрагмента хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, 5 а.о.) препятствовало формированию пространственной структуры целевого белка [38].

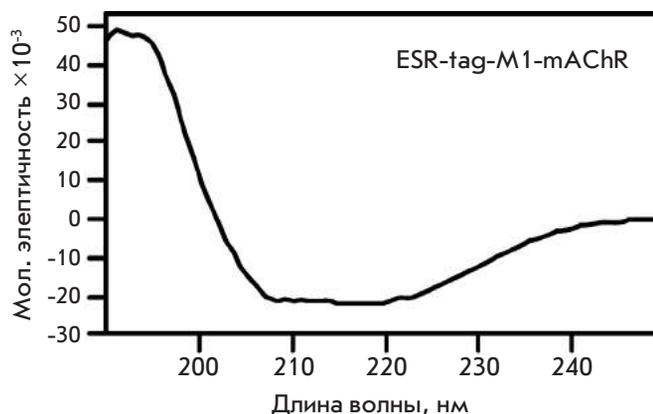
**Анализ рекомбинантных GPCR**

Очищенные препараты GPCR, солюбилизованные в «жестком» детергенте SDS (1%), проанализировали при помощи электрофореза в ПААГ. Репрезентативные фрагменты электрофореграмм показаны на рис. 3. Полученные препараты, как и препараты



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ синтезированных GPCR с различными N-концевыми партнерами после очистки с помощью  $Ni^{2+}$ -аффинной хроматографии. В образцах выявлены как мономеры, димеры и тримеры рецепторов, так и агрегаты более высокого порядка. 1 – маркеры молекулярной массы; 2, 5, 9 – рецепторы, синтезированные без N-концевых партнеров (П.Э. – прямая экспрессия); 3, 6, 10 – рецепторы с последовательностью S-tag; 4, 7, 11 – рецепторы с последовательностью T7-tag; 8 – ESR-tag-M1-mAChR

других МБ [39], имели аномальную электрофоретическую подвижность, вызванную, вероятно, неполной денатурацией молекул МБ SDS. На электрофореграммах выявлены отдельные полосы, соответствующие мономерам, димерам, тримерам рецепторов и агрегатам более высокого порядка (рис. 3). Подобное поведение типично для GPCR, которые в составе биологической мембраны формируют димеры и тримеры, а также склонны к спонтанной агрегации из-за гидрофобных взаимодействий ТМ-спиралей даже в растворах «жестких» детергентов [31]. Степень агрегации препаратов GPCR зависела от типа рецептора и последовательности N-концевого партнера, а также, возможно, от концентрации белкового препарата в образце. Так, например, наибольшее количество высокомолекулярных агрегатов отмечено в образце S-tag-M1-mAChR, синтез которого был наиболее эффективным. Методом КД-спектроскопии проанализирована вторичная структура гибрида ESR-tag-M1-mAChR, который в растворе SDS обладал меньшей степенью агрегации (рис. 4). Анализ полученных данных выявил преобладание  $\alpha$ -спиральной структуры ( $\alpha$ -спираль – 65%,  $\beta$ -лист – 4%,  $\beta$ -поворот – 9%, неупорядоченная структура – 22%), что указывает на частично сформированную вторичную структуру рецептора в окружении молекул SDS. Следует



**Рис. 4.** КД-спектр ESR-tag-M1-mAChR в растворе 1% SDS

отметить, что содержание  $\alpha$ -спиральных элементов в молекуле укороченного рецептора M1-mAChR, рассчитанное по аналогии с известными кристаллическими структурами M2 и M3-mAChR [8, 9], должно составлять ~ 72%.

Для дальнейшего изучения рекомбинантных GPCR необходима либо оптимизация процедуры солюбилизации целевых белков из осадка РС с последующей разработкой методов ренатурации полученных препаратов, либо применение мембраномоделирующих сред в процессе бесклеточного синтеза, что в некоторых случаях позволяет синтезировать МБ в функционально активной форме [13, 15, 34, 35].

### ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в нашей работе, показали, что применение в качестве N-концевых партнеров аминокислотных последовательностей ESR-tag, S-tag и белка Mistic позволяет добиться высокоэффективной продукции GPCR человека в бесклеточной системе на основе S30 экстракта из *E. coli*. Использование этих последовательностей обеспечивает продукцию целевых белков (0.6–3.8 мг/мл) на уровне, достаточном для дальнейших структурно-функциональных исследований. Представленная работа впервые показывает возможность применения ESR-tag и S-tag для увеличения уровня гетерологической продукции МБ. ●

*Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ (грант № 11-04-01864-а), программой «У.М.Н.И.К.» и Министерством образования и науки (№ соглашений 8268 и 8789).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lundstrom K.H. *Structural Genomics on Membrane Proteins*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
2. Wallin E., von Heijne G. // *Protein Sci.* 1998. V. 7. № 4. P. 1029–1038.
3. Fredriksson R., Lagerström M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 63. № 6. P. 1256–1272.
4. Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 12. P. 993–996.
5. Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G., Kobilka B.K. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7245. P. 356–363.
6. McCusker E.C., Bane S.E., O'Malley M.A., Robinson A.S. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 3. P. 540–547.
7. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., et al. // *Science.* 2007. V. 318. № 5854. P. 1258–1265.
8. Haga K., Kruse A.C., Asada H., Yurugi-Kobayashi T., Shirosaki M., Zhang C., Weis W.I., Okada T., Kobilka B.K., Haga T., et al. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7386. P. 547–551.
9. Kruse A.C., Hu J., Pan A.C., Arlow D.H., Rosenbaum D.M., Rosemond E., Green H.F., Liu T., Chae P.S., Dror R.O., et al. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7386. P. 552–556.
10. Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., III, Skelton N.J., Rance M. *Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice*. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y.: Academic Press, 2006.
11. Kiefer H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1610. № 1. P. 57–62.
12. Shirokov V.A., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 375. P. 19–55.
13. Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 601. P. 165–186.
14. Klammt C., Schwarz D., Fendler K., Haase W., Dötsch V., Bernhard F. // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 6024–6038.
15. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarova L.N., Petrovskaya L.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. № 3. P. 349–358.
16. Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Piehler J., Haase W., Hahn S., Dötsch V., Bernhard F. // *J. Struct. Biol.* 2007. V. 158. № 3. P. 482–493.
17. Ishihara G., Goto M., Saeki M., Ito K., Hori T., Kigawa T., Shirouzu M., Yokoyama S. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 27–37.
18. Haberstock S., Roos C., Hoevels Y., Dötsch V., Schnapp G., Pautsch A., Bernhard F. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 82. № 2. P. 308–316.
19. Hall M.N., Gabay J., Debarbouille M., Schwartz M. // *Nature.* 1982. V. 295. P. 616–618.
20. Kudla G., Murray A.W., Tollervey D., Plotkin J.B. // *Science.* 2009. V. 324. № 5924. P. 255–258.
21. Хабибуллина Н.Ф., Люкманова Е.Н., Копейна Г.С., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биоорг. химия.* 2010. Т. 36. № 5. С. 654–660.
22. Greenwood M.T., Hukovic N., Kumar U., Panetta R., Hjorth S.A., Srikant C.B., Patel Y.C. // *Mol. Pharmacol.* 1997. V. 52. № 5. P. 807–814.
23. Hukovic N., Panetta R., Kumar U., Rocheville M., Patel Y.C. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 33. P. 21416–21422.
24. Kaye R.G., Saldanha J.W., Lu Z.L., Hulme E.C. // *Mol. Pharmacol.* 2011. V. 79. № 4. P. 701–709.
25. Shapiro R.A., Nathanson N.M. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 22. P. 8946–8950.
26. Gether U., Lin S., Ghanouni P., Ballesteros J.A., Weinstein H., Kobilka B.K. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 22. P. 6737–6747.
27. Fraser C.M. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 16. P. 9266–9270.
28. Savarese T.M., Wang C.D., Fraser C.M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 16. P. 11439–11448.
29. Roth C.B., Hanson M.A., Stevens R.C. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. № 5. P. 1305–1319.
30. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Spirina E.V., et al. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. № 19. P. 4193–4196.
31. Петровская Л.Е., Шульга А.А., Бочарова О.В., Ермолюк Я.С., Крюкова Е.А., Чупин В.В., Бломмерс М.Ж.Ж., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 7. С. 1001–1013.
32. Chowdhury A., Feng R., Tong Q., Zhang Y., Xie X.Q. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 83. № 2. P. 128–134.
33. Terpe K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60. № 5. P. 523–533.
34. Klammt C., Perrin M.H., Maslennikov I., Renault L., Krupa M., Kwiatkowski W., Stahlberg H., Vale W., Choe S. // *Protein Sci.* 2011. V. 20. P. 1030–1041.
35. Zuker M. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 13. P. 3406–3415.
36. Kaiser L., Graveland-Bikker J., Steuerwald D., Vanberghem M., Herlihy K., Zhang S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 41. P. 15726–15731.
37. Michel E., Wüthrich K. // *J. Biomol. NMR.* 2012. V. 53. № 1. P. 43–51.
38. Goerke A.R., Swartz J.R. // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 99. № 2. P. 351–367.
39. Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 6. P. 1760–1765.

УДК 577.217.34

# Идентификация нового РНК-белкового контакта в комплексе рибосомного белка S7 с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК *Escherichia coli*

А. В. Головин<sup>1</sup>, Г. А. Хайруллина<sup>1</sup>, Б. Крааль<sup>3</sup>, А. М. Копылов<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3<sup>3</sup>Химический институт Лейденского университета, Лейден, 2300RA, Нидерланды

\*E-mail: kopylov.alex@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2012

**РЕФЕРАТ** Самосборка 30S малой субчастицы прокариотических рибосом *in vitro* из рРНК и 20 белков происходит иерархически и начинается взаимодействием 16S рРНК с тремя ключевыми белками: S4, S8 и S7. Эти же белки регулируют трансляцию своих оперонов, узнавая мРНК, поэтому изучение РНК-белковых взаимодействий в бинарных комплексах важно для понимания биогенеза рибосом. В представленной работе идентифицирован необычный рРНК-белковый контакт в бинарном комплексе рекомбинантного рибосомного белка S7 со своим участком связывания на фрагменте 16S рРНК *Escherichia coli* (236 нуклеотидов). Методом УФ-индуцируемых РНК-белковых сшивок показано, что белок S7 сшивается с нуклеотидом U1321 16S рРНК. Проведена аннотация опубликованных рРНК-белковых сшивок белка S7 в составе 30S субчастицы *E. coli* в растворе и данных рентгеноструктурного анализа 30S субчастицы. Сшивка, обнаруженная в бинарном комплексе, отличается от сшивок в целой субчастице в растворе, а также от контактов в структуре субчастицы в кристалле. По-видимому, структура бинарного рРНК-белкового комплекса, образующегося в начале сборки малой субчастицы, подвергается перегруппировке в процессе формирования целой субчастицы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рибосома, самосборка, рибосомный белок S7, УФ-индуцируемая сшивка.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** РСА – рентгеноструктурный анализ; РНП – рибонуклеопротеид; EcoS7, TthS7, BstS7 – белки S7 *E. coli*, *T. thermophilus* и *B. stearothermophilus* соответственно; Eco16S, Tth16S и Bst16S – фрагменты D3LH 16S рРНК *E. coli*, *T. thermophilus* и *B. stearothermophilus* соответственно; Tth30S и Eco30S – малые субчастицы рибосом *T. thermophilus* и *E. coli* соответственно.

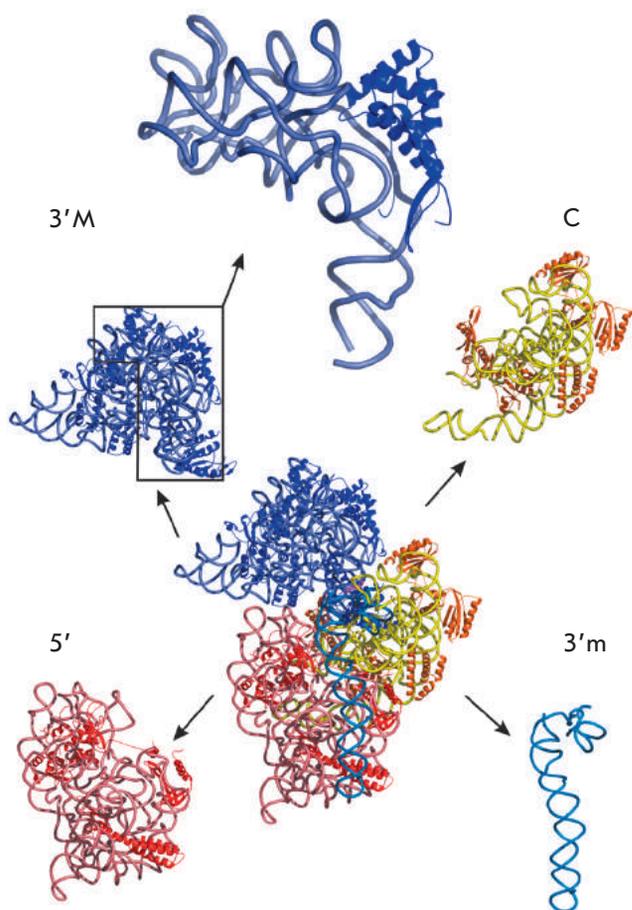
## ВВЕДЕНИЕ

Самосборка бактериальных рибосом *in vitro* описана довольно подробно [1–5]. Известна феноменология событий, которые приводят к формированию отдельных субчастиц рибосом, однако детальный анализ взаимодействия рРНК и белков только начинается.

При образовании прокариотических 70S рибосом происходит раздельная сборка двух субчастиц: 30S малой и 50S большой. Малая субчастица рибосом *Escherichia coli* состоит из 16S рРНК длиной 1542 нуклеотида и 20 разных белков среднего размера. Определяющую роль в самосборке 30S субчастицы играют белки, которые первыми связываются с 16S рРНК (S4, S7, S8, S15), что приводит к формированию так называемого «структурного остова» малой

субчастицы [6, 7]. Очередная волна интереса к процессу сборки рибосом была вызвана расшифровкой структуры малой субчастицы термофильных и мезофильных рибосом при помощи рентгеноструктурного анализа (РСА) [8–10]. Появилась возможность описать последовательность событий при самосборке в конкретных структурных терминах [3, 4, 11]. Кроме того, потенциальная возможность вмешаться в процесс биогенеза рибосом может стимулировать создание принципиально новых мощных антибактериальных агентов.

В отличие от 50S субчастицы, экспериментальное изучение самосборки 30S субчастицы облегчается ярко выраженным дискретным характером ее структуры: она состоит из четырех доменов (рис. 1) [8, 9].



**Рис. 1.** Структура 30S малой субчастицы рибосом *T. thermophilus* по данным РСА (PDB 1FJF [8]). Обозначения доменов: 5' – 5'-концевой, С – центральный, 3'М – основной 3'-концевой и 3'm – минорный 3'-концевой. Белки изображены темно-синими, оранжевыми и красными лентами, 16S рРНК – светло-синей, голубой, желтой и розовой лентами. Наверху в крупном масштабе показана структура комплекса белка S7 с фрагментом 16S рРНК (Eco16S), экстрагированная *in silico*

Три РНП-домена способны собираться независимо [12–17]. Для основного 3'-концевого домена найден минимальный фрагмент 16S рРНК *E. coli* длиной 236 нуклеотидов (D3LN, Eco16S), способный специфически связываться с ключевым участником сборки субчастицы – белком S7 [18].

Настоящая работа посвящена изучению рРНК-белковых контактов в бинарном комплексе рекомбинантного рибосомного (р-) белка S7 с участком связывания на фрагменте 16S рРНК *E. coli* с использованием УФ-индуцированных РНК-белковых сшивок. Идентифицирован необычный рРНК-белковый

контакт – белок S7 сшивается с нуклеотидом U1321. Проведена аннотация опубликованных ранее рРНК-белковых сшивок белка S7 в 30S субчастице в растворе и данных РСА для кристалла малой субчастицы. Обнаруженная нами новая рРНК-белковая сшивка в бинарном комплексе не совпадает с аннотированными сшивками в целой субчастице. Можно предположить, что структура бинарного рРНК-белкового комплекса, образующегося на начальных этапах сборки малой субчастицы рибосом, должна подвергаться перестройке при образовании целой субчастицы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы полинуклеотидкиназа фага T4 (PNK) и буфер для PNK («New England Biolabs», США), обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (RT-AMV), ДНК-полимераза Taq, ингибитор РНКаз, протеиназа К, нуклеозидтрифосфаты и их дидезоксипроизводные («Roche», Германия),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  («Amersham», Германия), бычий сывороточный альбумин (BSA, MBI, «Fermentas», Литва), нитроцеллюлозные фильтры 0.45 мкм («Millipore HA», США; «Schleicher & Schuell» BA85, Германия), Ni-NTA-агароза («QIAGEN», Германия), фенолметилсульфонилфторид (PMSF, «Merck», Германия). Плазмида рFD3LN любезно предоставлена Л. Браки-Жингра (Монреальский университет, Канада).

Буфер А: 50 мМ Трис-НСl (рН 9.5), 1.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 20 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 мМ дитиотреитол (DTT), 0.005% NP-40, 5% диметилсульфоксид (DMSO), 1 мМ бетаин. Буфер Б: 40 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 12 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ NaCl, 10 мМ DTT, 2 мМ спермидин. Буфер В: 0.3 М NaAc (рН 5.2), 1 мМ EDTA, 0.2% фенол. Буфер Г: 50 мМ Hepes-КОH (рН 7.0), 100 мМ KCl. Буфер Д: 50 мМ Трис-НСl (рН 8.5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 60 мМ KCl, 10 мМ DTT, 0.5 мМ dNTP. Буфер Е: 20 мМ Трис-Ас (рН 7.8), 7 мМ  $\text{MgAc}_2$ , 300 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2% BSA.

### Выделение рекомбинантных белков S7 *E. coli* (EcoS7) и S7 *Thermus thermophilus* (TthS7) из суперпродуцентов *E. coli*

EcoS7 выделяли из суперпродуцента *E. coli* по протоколам фирмы «QIAGEN» как кратко описано ранее [19]. Клетки собирали центрифугированием, суспендировали в 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), содержащем 500 мМ NaCl и лизоцим. После инкубации добавляли глицерин до 10%, меркаптоэтанол до 5 мМ, PMSF до 0.5 мМ и Тритон X-100 до 1%. После обработки ультразвуком тельца включения растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, наносили на Ni-NTA-агарозу и после промывки концентрацию мочевины в элюенте понижали до нуля. Белок элюировали градиентом раствора имидазола 0–0.5 М в буфере 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 500 мМ NaCl, 1 мМ меркаптоэта-

нол, 5% глицерин, 0.5 мМ PMSF. Белок переводили диализом в буфер 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 0.2 мМ DTT, 5% глицерин, 0.5 мМ PMSF и хранили при -70°C. Перед комплексообразованием белок переводили в буфер 20 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 4 мМ MgAc<sub>2</sub>, 400 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 мМ EDTA, 4 мМ меркаптоэтанол. Белок TthS7 выделяли таким же образом [19, 20].

#### Аmplификация ДНК с помощью ПЦР

Фрагмент матричной ДНК амплифицировали с плазмиды pFD3LH, которая содержала кДНК минимального фрагмента 16S рРНК под контролем промотора фага Т7. ПЦР проводили в 50–400 мкл буфера А, содержащего 200 мМ dNTP, 20 пмоль праймеров, от 50 до 500 нг pFD3LH, 2–5 ед. акт. ДНК-полимеразы Taq. 5'-Концевой праймер AGGGATCСТААТАСГАСТСАСТАТАGGG соответствует промоторной последовательности РНК-полимеразы фага Т7 и комплементарен векторной последовательности; 3'-концевой праймер GTAAGCTTACAAGGCCCGGGAACGТАТТCACC комплементарен фрагменту G1370 –U1393 Eco16S (некомплементарная последовательность подчеркнута). Праймеры синтезированы фирмой «MWG-Biotech AG», Германия. ПЦР проводили в термоциклере («BioRad», США) в следующих условиях: предварительная инкубация – 95°C, 2 мин; цикл – 95°C, 45 с; 60°C, 30 с; 72°C, 30–60 с. После 25 циклов дополнительно инкубировали при 72°C в течение 4 мин. ДНК очищали электрофорезом в 1–2% агарозном геле, экстракцией тремя объемами (по массе геля) 6 М NaI (56°C, 5 мин) с последующей очисткой при помощи PCR Purification Kit («Roche», Германия).

#### Транскрипция фрагмента 16S рРНК (Eco16S) *in vitro*

Транскрипцию Eco16S проводили на ПЦР-копии матричной ДНК, содержащей промотор РНК-полимеразы фага Т7, в 100 мкл раствора следующего состава: 2.5 мМ NTP, 1000 ед. акт. РНК-полимеразы фага Т7, 60 ед. акт. ингибитора РНКаз, 1 мкг/мл пирофосфатазы, 4 мкг матрицы ДНК, в буфере Б при 37°C в течение 4 ч. После транскрипции раствор подвергли фенольной депротенинизации с последующей экстракцией хлороформом и осаждением этанолом. РНК очищали в 8% ПААГ с 7 М мочевиной и элюировали диффузией из геля в буфере В. После элюции РНК обрабатывали фенолом, хлороформом и осаждали этанолом. Осадок РНК растворяли в 50 мкл воды, целостность РНК проверяли электрофорезом в 8% ПААГ с 7 М мочевиной. Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм: 1 мг РНК – 22 о.е.

#### Получение комплексов EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

Комплексообразование проводили в 200 мкл буфера Е. РНК и белок ренатурировали отдельно при 37°C в течение 30 мин, смешивали и прогревали (37°C, 30 мин). Степень образования комплексов определяли сорбцией на нитроцеллюлозных мембранах при скорости фильтрации 0.5 мл/мин, титруя постоянное количество меченной <sup>32</sup>P РНК возрастающим количеством белка [19]. Радиоактивность фильтров определяли в 10 мл воды по Черенкову на счетчике Tracor Analytic (Франция). Кажущуюся константу диссоциации ( $aK_d$ ) рассчитывали с помощью программы XMGRACE, GNU (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>), используя следующее уравнение:

$$\alpha = \frac{P_0}{K_d * R_0 + R_0^2 + P_0 R_0},$$

где  $P_0$  – концентрация белка S7,  $R_0$  – фиксированная концентрация Eco16S,  $K_d$  ( $aK_d$ ) – кажущаяся константа диссоциации,  $\alpha$  – доля связанной в комплексе Eco16S.

#### УФ-индуцированная ковалентная РНК-белковая сшивка в комплексах EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

Комплексообразование проводили в 200 мкл буфера Е при концентрации РНК 150 нМ и 10-кратном мольном избытке белка. Белок ренатурировали при 37°C, смешивали с РНК и прогревали при 37°C в течение 30 мин. Комплекс в течение 10 мин облучали УФ-светом при 260 нм («Stratolinker», США, мощность 2400 мкВ) во льду с источником, удаленным на 15 см. Интенсивность облучения контролировали уридинометрией.

#### Получение меченных <sup>32</sup>P по 5'-концу олигодезоксирибонуклеотидных праймеров

Меченый праймер (3'-концевой праймер для ПЦР) для обратной транскрипции получали кинированием РНК в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ. РНК-буфер (10 мкл), содержащий 20 пмоль праймера, 3 мкл [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (0.4 МБк/мкл), 10 ед. акт. РНК, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 90 мкл 0.3 М NaAc (pH 5.2) с последующей фенольной депротенинизацией и экстракцией хлороформом. Праймер осаждали этанолом и растворяли в 40 мкл воды.

#### Картирование нуклеотида Eco16S, сшитого с белком S7, в комплексах EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

После облучения комплекс обрабатывали протеиназой К для удаления белка S7. Нуклеотид Eco16S,

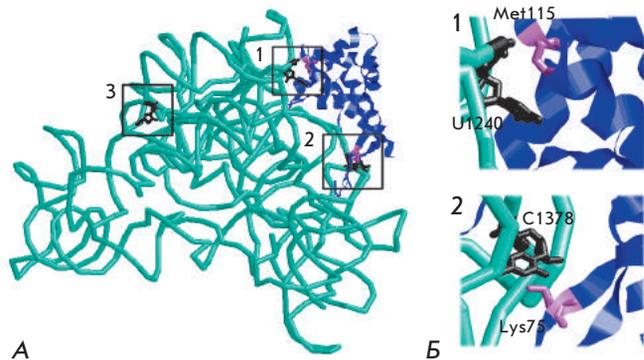
сшитый с белком S7, картировали при помощи обратной транскрипции, используя меченный по 5'-концу праймер. Гибридизацию праймера с РНК проводили в 4.5 мкл буфера Г, содержащего 2–5 пмоль РНК и 0.5 пмоль праймера. РНК денатурировали при 95°C в течение 1 мин с последующим медленным охлаждением до 42.5°C. Обратную транскрипцию проводили в 8.5 мкл буфера Д, содержащего 2.2 ед. акт. RT-AMV при той же температуре в течение 1 ч. В контрольном

секвенировании добавляли 70–400 мкМ одного из ddNTP. Образцы анализировали в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

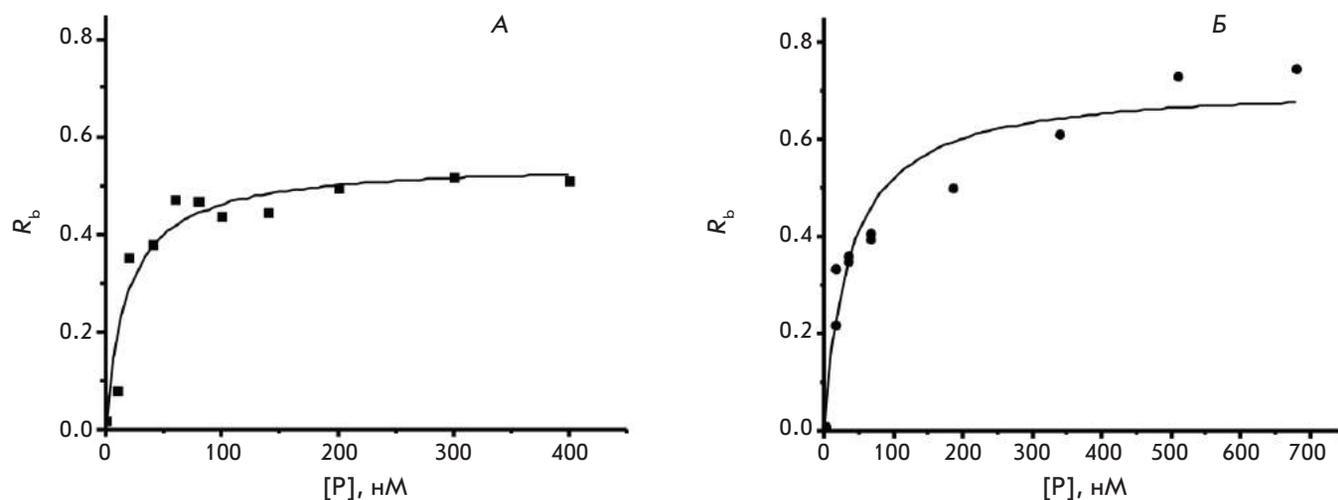
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Известная на настоящий момент пространственная структура 30S малой субчастицы рибосом получена как для термофильных бактерий *T. thermophilus* (Tth30S) методом PCA [8, 9], так и для *E. coli* [10]. Биохимических данных, описывающих сборку 30S субчастицы *T. thermophilus* в растворе, не существует, установлена только возможность доменной сборки [14, 15, 17]. Основная масса биохимических данных по самосборке рибосом получена на рибосомах *E. coli*. В связи с этим безусловный интерес представляет анализ корреляции биохимических данных, полученных для Eco30S в растворе, и данных PCA для Eco30S и Tth30S.

РНК-белковые шивки широко использовались для изучения контактов в 30S субчастице бактериальных рибосом в растворе. Описано несколько шивок 16S рРНК и белка S7 в составе 30S субчастицы *E. coli* (таблица). Две такие характерные шивки идентифицированы достоверно – это U1240–Met115 и C1378–Lys75, что хорошо коррелирует с данными PCA кристаллов (таблица, рис. 2). Поэтому в настоящей работе мы использовали УФ-индуцируемое сшивание для идентификации возможных рРНК-белковых контактов в бинарном комплексе фрагмента Eco16S с белком S7. Ранее было показано, что комплекс белка S7 с целой 16S рРНК при УФ-облучении образует шивку [32], однако, сшиваемые остатки не были установлены.



**Рис. 2.** Корреляция данных PCA 30S субчастицы *E. coli* в кристалле и данных по шивкам этой субчастицы в растворе. А – Структура комплекса EcoS7–Eco16S, экстрагированная *in silico* из Eco30S. Голубая лента – Eco16S, синяя лента – белок S7. Рамками обозначены РНК-белковые шивки: 1 – U1240–Met115; 2 – C1378–Lys75; 3 – U1321–белок S7 в бинарном комплексе, данная работа (таблица). Б – Увеличенное изображение рРНК-белковых контактов рис. 2А



**Рис. 3.** Изотермы связывания для комплексов EcoS7–Eco16S (А) и TthS7–Eco16S (Б).  $aK_d = 21.5 \pm 1.9$  и  $35.8 \pm 9.3$  нМ соответственно. Исходная концентрация Eco16S – 20 нМ, [P] – концентрация белка,  $R_b$  – доля связанной с белком Eco16S

Анализ корреляции данных РСА 30S субчастицы рибосом *E. coli* и данных по сшивкам 16S рРНК–белок S7 в 30S субчастице в растворе

№	Сшивка с 16S рРНК	Сшивка с белком S7	Расстояние в Eco30S, Å	Реагент	Размер реагента, Å	Ссылка
1.1	A1238–U1240	S7	3.0	АФИ	8.6	[21]
1.2	A1238–U1240	S7	3.0	ИТ	5	[22]
1.3*	U1240	M115**	2.7	ИТ	5	[23–25]
1.4	U1240***	S7	2.7	УФ	0	[26]
1.5	16S рРНК	M115**	2.7	УФ	0	[27]
2.1	A1377–C1378	S7	3.8	ИТ	5	[22]
2.2	C1378	K75	3.8	ИТ	5	[25]

**Примечания.** Нумерация в первом столбце: первая цифра обозначает номер контакта – 1 (1238–1240) или 2 (1377–1378), вторая цифра – порядковый номер сшивки: 1–5 для первого контакта, 1–2 для второго. АФИ – метил-*p*-азидофенилацетимидат; ИТ – 2-иминотиолан.

\*Аналогичная сшивка идентифицирована в малой субчастице *Bacillus stearothermophilus* (Met115 Bst7) [24, 27].

\*\*В работах [23–25, 27] Met115 обозначается как Met114 (ошибка в секвенировании белка EcoS7 [28], пропущен R91 [29]).

\*\*\*До 1979 г. использовали ошибочную нумерацию 16S рРНК [30] (U1239 вместо U1240).

**Данные, не включенные в таблицу.** А) 30S субчастица *E. coli*. 1. Идентифицирована сшивка C1265 16S рРНК с белком S7 [30]. C1265 находится на расстоянии 35 Å от ближайшего аминокислотного остатка белка S7 в Eco30S. 2. Идентифицированы сшивки 278–280, 1139–1144, 1155–1158, 1531–1542 16S рРНК с белком S7 [31]. Минимальное расстояние между районом 1531–1542 16S рРНК и белком S7 в Eco30S составляет 11 Å. Б) 30S субчастица *B. stearothermophilus*: идентифицирована сшивка 16S рРНК с Lys8 белка S7 [27].

Как показала Браки-Жингра и соавт. [18] белок EcoS7 способен связываться с небольшим фрагментом 16S рРНК (236 нуклеотидов, D3LH, Eco16S) – узловым элементом структуры основного 3'-концевого домена 16S рРНК. Комплекс EcoS7 и Eco16S авторы получали с использованием EcoS7, выделенного стандартным методом из суммарного белка рибосом [33]. Кажущаяся константа диссоциации комплекса ( $aK_d$ ) такого белка была довольно высокой –  $620 \pm 80$  нМ [18]. В дальнейшем использовали рекомбинантный белок, содержащий шесть дополнительных остатков гистидина (6 His) на N-конце. Рекомбинантный белок также связывался с Eco16S, его  $aK_d$  была гораздо меньше в диапазоне 110–210 нМ [34, 35]. Как полагают, дополнительный фрагмент, содержащий 6 His, не влияет на связывание белка с 16S рРНК [35], а различие в константах отражает разницу в методах выделения. В настоящей работе был использован рекомбинантный белок EcoS7, который имел N-концевые 6 His [19]. Комплекс EcoS7 с Eco16S оказался более стабильным, чем считалось [34, 35], а его  $aK_d$  составляла  $21.5 \pm 1.9$  нМ (рис. 3), что свидетельствует о высокой активности.

Комплекс EcoS7–Eco16S облучали УФ-излучением, эффективность сшивки оценивали электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях по соотношению радиоактивности в зоне РНП к суммарной радиоактивности рРНК. Время облучения выбирали при максимальном значении выхода сшитого РНП. Для идентификации контакта Eco16S с EcoS7 положение сшитых с белком гетероциклических оснований рРНК определяли с помощью обратной транскрипции после гидролиза белка протеиназой K, принимая во внимание, что обратная транскриптаза останавливается за один нуклеотид до модифицированного. Анализ «сшитого» комплекса Eco16S с EcoS7 (рис. 4, дорожка 2) однозначно выявляет уникальный стоп-сигнал, соответствующий нуклеотиду C1322 (сшивка с U1321). В остальных местах дополнительных «стопов» не обнаружено. Положение сшивки показано на третичной структуре 30S субчастицы рибосом *E. coli* (рис. 2).

Идентифицированный контакт Eco16S рРНК с белком EcoS7 отличается от уже известных контактов, образующихся при сшивании 16S рРНК с белком S7 в малой субчастице рибосом *E. coli* в растворе (*ma-*

блица). Более того, найденный нами контакт Eсo16S с белком EсoS7 не соответствует и структуре аналогичного РНП-домена в составе 30S субчастицы *E. coli* в кристалле (рис. 2): ближайший к U1321 аминокислотный остаток белка S7 расположен на расстоянии 35 Å (таблица).

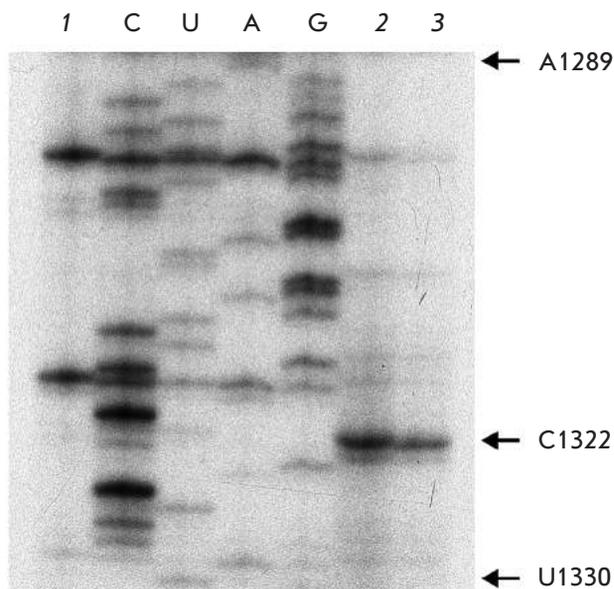


Рис. 4. Анализ сшивки EсoS7 и TthS7 с Eсo16S в бинарных комплексах. Фрагмент радиоавтографа электрофореза в 8% ПААГ с 8 М мочевиной продуктов обратной транскрипции Eсo16S с праймера. 1 – кДНК с Eсo16S рРНК после УФ-облучения. С, U, А, G – продукты секвенирования Eсo16S рРНК (A1289–U1330). 2, 3 – Анализ УФ-облученных комплексов Eсo16S рРНК с белками EсoS7 и TthS7 соответственно. Стрелкой указана зона, соответствующая C1322 (сшивка с U1321)

Найденное различие можно объяснить тем, что при взаимодействии белка S7 с 16S рРНК на начальных этапах самосборки рибосомы структура образуемого бинарного комплекса отличается от конечной структуры соответствующего РНП-домена в составе субчастицы. Исходя из анализа структуры РНП-домена в структуре Eсo16S и Tth30S, можно предположить, что для Eсo16S в бинарном комплексе с белком S7 скорее всего характерно развернутое состояние пучка из четырех спиралей (H30, H41, H42, H43), которые в кристаллической структуре Eсo16S и Tth30S упакованы вместе бок о бок [19]. Вероятно, для стабилизации бинарного комплекса в компактном состоянии при самосборке рибосом требуются дополнительные факторы, например, локально высокая концентрация ионов магния [19] или взаимодействие с другими белками домена. Это предположение согласуется с наличием у термофильных рибосом дополнительного особого белка Tth, который имеет сильно основной характер и, таким образом, может стабилизировать компактную структуру этого РНП-домена [8, 9].

Безусловный интерес представляет сравнительное изучение структуры гетерологичного комплекса белка TthS7 с Eсo16S. В данном случае белок TthS7 может рассматриваться как «природный мутант» белка EсoS7 [19]. Как показано нами ранее [19, 36], TthS7 может образовывать стабильные комплексы с Eсo16S. В данной работе гетерологичный комплекс имел  $aK_d$   $35.8 \pm 9.3$  нМ (рис. 3), что сравнимо с  $aK_d$  гомологичного комплекса EсoS7–Eсo16S ( $aK_d = 21.5 \pm 1.9$  нМ). Места контакта рекомбинантного TthS7 с фрагментом Eсo16S идентифицировали так же, как и в случае комплекса Eсo16S с EсoS7: с белком TthS7 сшивается U1321 (рис. 4). По-видимому, в гетерологичном комплексе существует похожий РНК-белковый контакт. Интересно, что позиция 1321 в 16S рРНК очень консервативна филогенетически, и замена выявлена только у термофильных 16S рРНК (рис. 5).

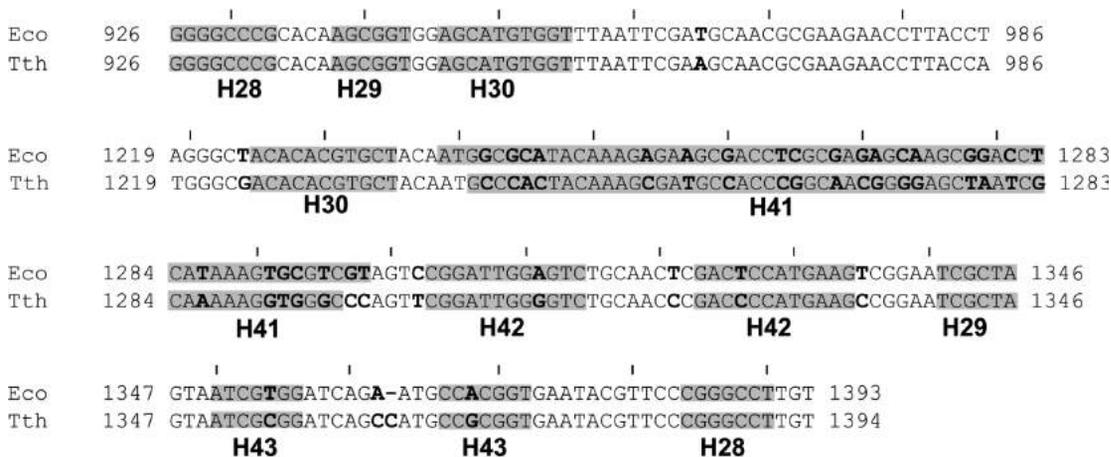


Рис. 5. Сравнение первичных структур фрагментов Eсo16S и Tth16S. Нумерация нуклеотидов в Eсo16S стандартная, в Tth16S – согласно PDB 1FJF [12] для Tth30S. Жирным выделены неидентичные нуклеотиды. Двухтяжевые участки выделены серым

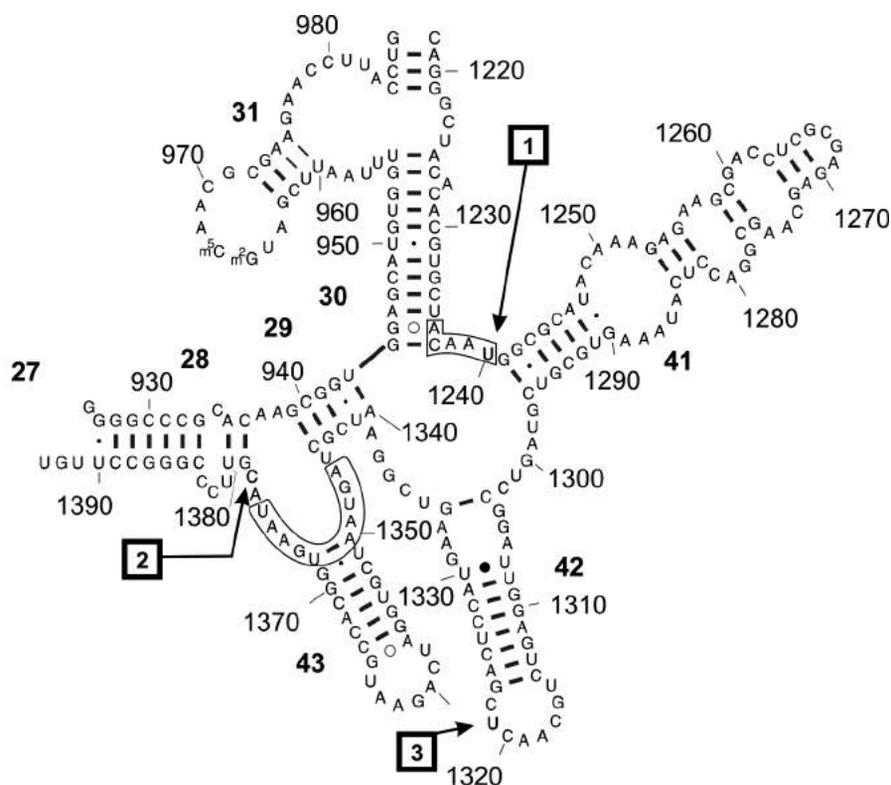


Рис. 6. Модель вторичной структуры фрагмента основного 3'-концевого домена 16S рРНК (D3LH, Eco16S), использованного в данной работе [18]. РНК-белковые сшивки указаны стрелками. Данные по сшивкам взяты из таблицы. Для 30S субчастицы рибосом *E. coli*: 1 – сшивка U1240–M115; 2 – сшивка C1378–K75. Для бинарного комплекса: 3 – сшивка U1321–белок S7, идентифицированная в нашей работе. В рамках показаны участки 16S рРНК, идентичные участку связывания S7 на стрептомициновой мРНК [30]

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что для изучения первых этапов сборки малой субчастицы рибосом бактерий можно получать бинарные комплексы рибосомного белка S7 с его локальным участком связывания на 16S рРНК. Такая возможность хорошо согласуется с показанной ранее возможностью сборки отдельных доменных РНП-комплексов бактериальных рибосом [5, 37]. При УФ-облучении бинарных комплексов (260 нм) как в гомологичном (EcoS7–Eco16S), так и в гетерологичном (TthS7–Eco16S) комплексе с белком S7 сшивается остаток U1321. Как результат поиска сходных структур в 16S рРНК и мРНК Сайто и Номура [38] предположили, что рекомбинантный белок S7 узнает определенный мотив в структуре 16 рРНК, расположенный рядом с обнаруженной сшивкой (рис. 6). Более того, идентифицирована сшивка белка S7 с фрагментом мРНК рядом с предполагаемым мотивом [39]. Совокупность этих данных говорит

в пользу предположения Сайто и Номуры [38] о возможности первичного узнавания белком S7 данного мотива РНК.

Можно предположить, что формирование целой малой субчастицы рибосом приводит к реорганизации контактов в первоначальном бинарном комплексе. Подобная перегруппировка наблюдается и в других РНК-белковых комплексах; например, в комплексах тРНК с фенилаланин-тРНК-синтетазой [40]. Интересные перегруппировки обнаружены и при диссоциации бинарных РНК-белковых комплексов [41]. ●

Авторы благодарят А.А. Богданова, Ю. Брозиуса, Т.И. Рассохина, Т.С. Рождественского, В.А. Спиридонову за интерес, полезные дискуссии и поддержку.

Работа поддержана DAAD, РФФИ (грант № 11-04-01990-а), РФФИ-НВО (гранты № 03-04-89001, 047.015.018).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin A.S. // Ribosomes / Ed. Siekevitz P. N.Y.: Kluwer Acad./Plenum Publ., 1999. P. 98–101.
2. Nomura M. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6857–6864.
3. Culver G.M. // Biopolymers. 2003. V. 68. P. 234–249.
4. Williamson J.R. // RNA. 2003. V. 9. P. 165–167.
5. Mulder A.M., Yoshioka C., Beck A.H., Bunner A.E., Milligan R.A., Potter C.S., Carragher B., Williamson J.R. // Science.

2010. V. 330. № 6004. P. 673–677.
6. Bogdanov A.A., Kopylov A.M., Shatsky I.N. // Subcell. Biochem. 1980. V. 7. P. 81–116.
7. Nowotny V., Nierhaus K.H. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 7051–7055.
8. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vornrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. // Nature. 2000. V. 407. P. 327–339.

9. Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A. // *Cell*. 2000. V. 102. P. 615–623.
10. Dunkle J.A., Xiong L., Mankin A.S., Cate J.H.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 17152–17157.
11. Копылов А.М. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. С. 372–382.
12. Weitzmann C.J., Cunningham P.R., Nurse K., Ofengand J. // *FASEB J*. 1993. V. 7. P. 177–180.
13. Samaha R.R., O'Brien B., O'Brien T.W., Noller H.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 7884–7888.
14. Agalarov S.C., Selivanova O.M., Zheleznyakova E.N., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Spirin A.S. // *Eur. J. Biochem*. 1999. V. 266. P. 533–537.
15. Agalarov S.C., Zheleznyakova E.N., Selivanova O.M., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Vasiliev V.D., Spirin A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 999–1003.
16. Jagannathan I., Culver G.M. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. P. 373–383.
17. Serdyuk I., Ulitin A., Kolesnikov I., Vasiliev V., Aksenov V., Zaccai G., Svergun D., Kozin M., Willumeit R. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 292. P. 633–639.
18. Dragon F., Brakier-Gingras L. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 1199–1203.
19. Рассохин Т.И., Головин А.В., Петрова Е.В., Спиридонова В.А., Каргинова О.А., Рождественский Т.С., Брозис Ю., Копылов А.М. // *Молекуляр. биология*. 2001. Т. 35. С. 617–627.
20. Karginov A.V., Karginova O.A., Spiridonova V.A., Kopylov A.M. // *FEBS Lett.* 1995. V. 369. P. 158–160.
21. Osswald M., Greuer B., Brimacombe R., Stoffler G., Baumert H., Fasold H. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 3221–3240.
22. Wower I., Brimacombe R. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 1419–1437.
23. Urlaub H., Thiede B., Muller E.C., Wittmann-Liebold B. // *J. Protein Chem.* 1997. V. 16. P. 375–383.
24. Urlaub H., Krufft V., Wittmann-Liebold B. *Methods in Protein Structure Analysis*. N.Y.: Plenum Press, 1995. P. 275–282.
25. Urlaub H., Thiede B., Muller E.C., Brimacombe R., Wittmann-Liebold B. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 14547–14555.
26. Zwieb C., Brimacombe R. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. P. 1775–1790.
27. Urlaub H., Krufft V., Bischof O., Muller E.C., Wittmann-Liebold B. // *EMBO J*. 1995. V. 14. P. 4578–4588.
28. Reinbolt J., Tritsch D. // *FEBS Lett.* 1978. V. 91. P. 297–301.
29. Johanson U., Hughes D. // *Gene*. 1992. V. 120. P. 93–98.
30. Ehresmann B., Backendorf C., Ehresmann C., Millon R., Ebel J.P. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 104. P. 255–262.
31. Greuer B., Osswald M., Brimacombe R., Stoffler G. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 3241–3255.
32. Ehresmann B., Reinbolt J., Backendorf C., Tritsch D., Ebel J. // *FEBS Lett.* 1976. V. 67. P. 316–319.
33. Wittmann H.G. *Ribosomes*. Cold Spring Harbor: CSHL, 1974. P. 93–114.
34. Robert F., Brakier-Gingras L. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 677–682.
35. Robert F., Gagnon M., Sans D., Michnick S., Brakier-Gingras L. // *RNA*. 2000. V. 6. P. 1649–1659.
36. Spiridonova V.A., Golovin A.V., Drygin D.Yu., Kopylov A.M. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 44. P. 1141–1146.
37. Agalarov S.C., Selivanova O.M., Zheleznyakova E.N., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Spirin A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 266. № 2. P. 533–537.
38. Saito K., Nomura M. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 235. № 1. P. 125–139.
39. Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 25. P. 5858–5862.
40. Klipcan L., Moor N., Finarov I., Kessler N., Sukhanova N., Safro M.G. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 415. № 3. P. 527–537.
41. Anunciado D., Dhar A., Gruebele M., Baranger A.M. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 408. P. № 5. P. 896–908.

УДК 577.113.3.:577.152.111\*205'134

# Карбоциклические аналоги инозин-5'-монофосфата: синтез и биологическая активность

Е. С. Матюгина<sup>1</sup>, С. Н. Андреевская<sup>2</sup>, Т. Г. Смирнова<sup>2</sup>, А. Л. Хандажинская<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

\*E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 03.08.2012

**РЕФЕРАТ** Осуществлен синтез 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантина и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантина – изостерных карбоциклических аналогов инозин-5'-монофосфата. Показано, что синтезированные соединения способны ингибировать активность инозинмонофосфатдегидрогеназы (IMPDH II) человека ( $EC_{50} = 500$  мкМ) и в концентрациях до 500 мкМ не влияют на рост *Mycobacterium tuberculosis*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** карбоциклические нуклеозиды, конкурентное ингибирование, инозин-5'-монофосфат, IMPDH II человека, *Mycobacterium tuberculosis*.

## ВВЕДЕНИЕ

Инозинмонофосфатдегидрогеназа (IMPDH, [КФ 1.1.1.205]) – один из ключевых ферментов биосинтеза *de novo* пуриновых нуклеотидов (GTP и dGTP). Природным субстратом IMPDH служит инозин-5'-монофосфат (IMP). IMPDH катализирует  $NAD^+$ -зависимую реакцию, приводящую к образованию NADH и ксантозин-5'-монофосфата, который затем превращается в гуанозин-5'-монофосфат (GMP). Ингибирование IMPDH приводит к понижению внутриклеточного уровня гуанинсодержащих нуклеотидов, обеспечивая антимикробный, антипаразитарный, антивирусный, противоопухолевый и иммуноподавляющий эффекты [1, 2].

Существующие ингибиторы IMPDH по месту связывания с ферментом делятся на три группы: аналоги IMP, аналоги  $NAD^+$  и аллостерические ингибиторы. Модифицированные нуклеозиды, принадлежащие к первой группе, подвергаются внутриклеточному фосфорилированию и в виде 5'-монофосфатов конкурентно взаимодействуют с центром связывания IMP. Среди аналогов IMP есть обратимые (5'-монофосфаты рибавирина, 3-дезагуанозина, мизорибина) и необратимые ингибиторы (5'-монофосфаты 2-винилинозина, 6-хлорпуридиннуклеозида, 5-этинил-1-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид). Наиболее известными представителями второй группы ингибиторов являются тиазофуридин, селеназофуридин и микофеноловая кислота.

IMPDH человека представлена двумя изоформами – I и II, гомологичными на 84%. Фермент типа I преобладает в нормальных лимфоцитах и лейкоцитах, типа II – в активно делящихся и опухолевых клетках. Бактериальные IMPDH из разных источников значительно отличаются от фермента человека, процент гомологии составляет 30–41%. Средство IMPDH из разных источников к одним и тем же ингибиторам может существенно различаться [2]. Например, IMPDH II человека более чувствительна к микофеноловой кислоте ( $K_i = 7$  нМ), чем IMPDH I ( $K_i = 33$  нМ), а активность данного соединения в отношении бактериальных ферментов еще ниже ( $K_i = 0.2–20$  мкМ) [2]. Селективность IMPDH в отношении ингибиторов делает этот фермент весьма привлекательной мишенью для потенциальных противоопухолевых, антимикробных и антипаразитарных препаратов [2].

Ингибирование IMPDH из *Mycobacterium tuberculosis*, как показано недавно, подавляет рост этой бактерии [3]. В настоящий момент основная задача в терапии туберкулеза – поиск новых препаратов, эффективных против штаммов, устойчивых к существующим лекарственным средствам. Механизм действия новых препаратов должен отличаться от механизма уже используемых лекарств, поэтому целесообразным представляется поиск новых противотуберкулезных агентов не среди представителей известных классов антибиотиков, а среди соединений другой природы, нацеленных на иные

ферменты-мишени. Среди лекарственных средств, применяемых при туберкулезе, нет аналогов нуклеозидов, что в сочетании с их потенциальной активностью в отношении IMPDH позволяет считать такие аналоги перспективными для изучения в качестве антимикобактериальных средств.

В представленной работе описан синтез 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)-гипоксантина (**1**) и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроциклопент-1'-ил)гипоксантина (**2**) (рис. 1) – изостерных карбоциклических аналогов IMP, и оценена способность соединений **1** и **2** ингибировать IMPDH II человека и подавлять рост *M. tuberculosis*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы коммерчески доступные реактивы и растворители («Acros», «Aldrich» и «Fluka»). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> («Merck») в системах: CHCl<sub>3</sub>–MeOH, 98 : 2 (система А); CHCl<sub>3</sub>–MeOH, 9 : 1 (система Б), диоксан–NH<sub>3</sub>, 4 : 1 (система В), изопропанол–NH<sub>3</sub>–вода, 7 : 2 : 1 (система Г). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel (40–63 мкм, «Merck»), обращенно-фазовом силикагеле Lichroprep RP-18 и ионообменной смоле DEAE-Toyorearl. Системы для элюции указаны в тексте.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР, <sup>31</sup>P-ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 («Bruker») с рабочей частотой 400 МГц для <sup>1</sup>H-ЯМР (приведены химические сдвиги относительно внутренних стандартов – Me<sub>4</sub>Si для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D<sub>2</sub>O) и 162 МГц для <sup>31</sup>P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия; приведены химические сдвиги относительно внешнего стандарта – 85% фосфорной кислоты). Химические сдвиги приведены в миллионных долях.

Исходный 6-хлор-9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**3**) был синтезирован по ранее описанной методике [4].

### 6-Этокси-9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**4**)

К раствору соединения **3** (300 мг, 13 ммоль) в 10 мл этанола добавляли прокаленный K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 мг, 2.3 ммоль), полученную суспензию кипятили в течение 1 ч. Ход реакции контролировали посредством ТСХ (система А). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, для элюции использовали систему Б, целевые фракции концентрировали в вакууме. Выделили 220 мг (78%) продукта **4** в виде белой пены. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 8.42 (1 H, с, H<sub>2</sub>), 7.95 (1 H, с, H<sub>8</sub>), 6.34–6.33 (1 H, м, H<sub>2</sub>), 5.82 (1 H, м, H<sub>3</sub>), 5.34–5.32 (1 H, м, H<sub>1</sub>), 4.86 (1 H, м, H<sub>4</sub>), 4.64–4.62 (2 H, м, O-CH<sub>2</sub>), 3.02–2.98 (1 H, м, H<sub>a5</sub>), 2.23–2.19 (1 H, м, H<sub>b5</sub>), 1.5–1.48 (3 H, м, CH<sub>3</sub>).

### 6-Этокси-9-(4'-этилфосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)пурин (**5**)

К раствору соединения **4** (230 мг, 0.93 ммоль) в 5 мл диметилформамида (ДМФА) при перемешивании в токе аргона добавляли NaN (33.5 мг, 1.4 ммоль) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (234 мг, 0.72 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1.5 ч при комнатной температуре, добавляли раствор этилового эфира *n*-толуолсульфон илоксиметилфосфоновой кислоты (334 мг, 1.8 ммоль) в 2 мл ДМФА, и раствор перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ (система В). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl, элюировали линейным градиентом NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0–0.2 М), целевой продукт **5** элюировали 0.1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, полученный раствор концентрировали, целевой продукт выделяли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом LiChroprep RP-18, элюировали линейным градиентом водного этанола (0–10%), продукт элюировали 8% раствором этанола в воде. Получили 240 мг (67%) продукта **5** в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.14 (1 H, с, H<sub>2</sub>), 8.06 (1 H, с, H<sub>8</sub>), 6.34–6.32 (1 H, м, H<sub>2</sub>), 6.15 (1 H, м, H<sub>3</sub>), 5.35 (1 H, м, H<sub>1</sub>), 4.63 (1 H, м, H<sub>4</sub>), 4.38 (2 H, м, O-CH<sub>2</sub>), 3.76–3.72 (2 H, м, O-CH<sub>2</sub>), 3.58–3.56 (2 H, м, O-CH<sub>2</sub>-P), 2.89 (1 H, м, H<sub>a5</sub>), 1.80 (1 H, м, H<sub>b5</sub>), 1.33–1.29 (3 H, м, CH<sub>3</sub>), 1.15–1.11 (3 H, м, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 17.99 с.

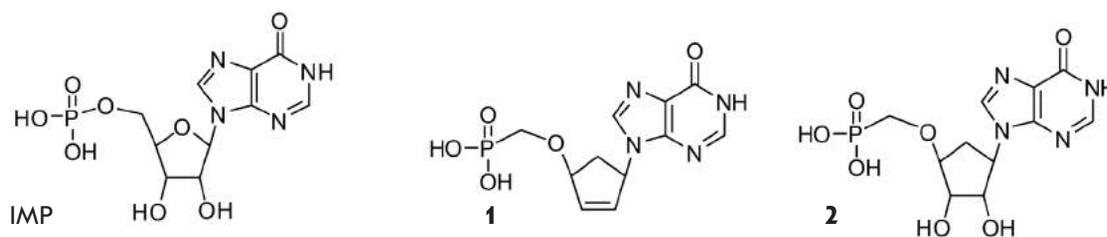


Рис. 1. Инозин-5'-монофосфат и его изостерные карбоциклические аналоги

**6-Этокси-9-(4'-этилфосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)пурин (6)**

К суспензии фосфоната **5** (200 мг, 0.54 ммоль) в смеси растворителей диоксан-вода (10 : 1) добавляли 0.5 М раствор тетраоксида осмия в диоксане и *N*-метилморфолиноксид (0.3 мл, 3 ммоль). Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали посредством ТСХ (система Г). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0–0.3 М) и далее на колонке с обращенно-фазовым силикагелем Lichroprep RP-18, элюировали водой. Выход продукта составил 74%. УФ-спектры ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7)  $\lambda_{\text{max}}$  252.0 нм ( $\epsilon$  9600).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 8.36 (1 H, с,  $\text{H}_2$ ), 8.29 (1 H, с,  $\text{H}_8$ ), 4.85 (1 H, м,  $\text{H}_1$ ), 4.23 (1 H, м,  $\text{H}_4$ ), 3.92–3.89 (2 H, м,  $\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.73 (2 H, м,  $\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.60–3.59 (2 H, м,  $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 2.88–2.85 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{a5}}$ ), 2.10 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{b5}}$ ), 1.37 (3 H, м,  $\text{CH}_3$ ), 1.21 (3 H, м,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 18.23 с.

**9-(4'-Фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)-гипоксантин (1)**

К суспензии фосфоната **5** (100 мг, 0.27 ммоль) в ДМФА при перемешивании в токе аргона добавляли триметилбромсилан (0.65 мл, 5 ммоль), и полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система В). Реакционную смесь нейтрализовали 25% водным аммиаком, растворитель удаляли в вакууме, остаток очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Выделили 70 мг (84%) продукта **1** в виде лиофилизата.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 8.39 (1 H, с,  $\text{H}_2$ ), 8.26 (1 H, с,  $\text{H}_8$ ), 6.44–6.42 (1 H, м,  $\text{H}_2$ ), 6.18–6.17 (1 H, м,  $\text{H}_8$ ), 5.57–5.55 (1 H, м,  $\text{H}_1$ ), 4.81 (1 H, м,  $\text{H}_4$ ), 3.61 (2 H, м,  $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 3.04 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{a5}}$ ), 1.93 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{b5}}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 16.66 с.

**9-(4'-Фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантин (2)**

Соединение **2** получали аналогично соединению **1**, исходя из соединения **6** (140 мг, 0.35 ммоль). Выделили 105 мг (81%) продукта в виде лиофилизата. УФ-спектры ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7)  $\lambda_{\text{max}}$  251.0 нм ( $\epsilon$  9300).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 8.27 (1 H, с,  $\text{H}_2$ ), 8.11 (1 H, с,  $\text{H}_8$ ), 4.20 (1 H, м,  $\text{H}_1$ ), 3.93 (1 H, м,  $\text{H}_4$ ), 3.53–3.51 (2 H, м,  $\text{O}-\text{CH}_2$ -P), 2.81 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{a5}}$ ), 2.07 (1 H, м,  $\text{H}_{\text{b5}}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 14.06 с.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ**

Эксперименты по изучению способности синтезированных соединений ингибировать IMPDH II человека проводила компания «NovoCib» (Франция). Соединения **1** и **2** исследовали в тестах с рекомбинантной IMPDH II человека (~0.0003 единиц актив-

ности на лунку) при 37°C в 200 мкл буфера ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 М, pH 7.8, NAD 250 мкМ, DTT 2 мМ) на 96-луночном планшете. Реакция начиналась с добавления субстрата, IMP, в концентрации 250 мкМ. До начала реакции соединения инкубировали в буфере с IMPDH II в течение 5 мин. Поглощение измеряли при 340 нм, на приборе iEMS Reader MF («Labsystems», Финляндия). В качестве положительного контроля использовали рибавирин. Влияние синтезированных соединений на активность IMPDH II человека тестировали одновременно в двух аналогичных экспериментах.

**Противотуберкулезная активность**

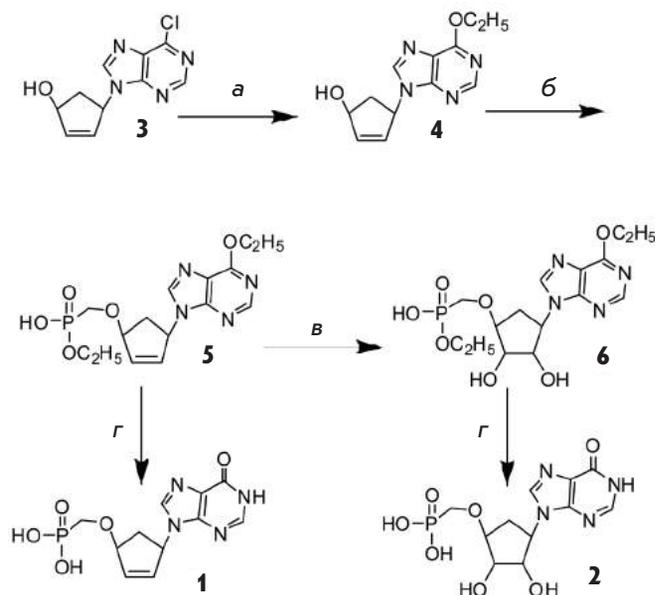
Препараты испытывали на чувствительном к противотуберкулезным препаратам лабораторном штамме *M. tuberculosis* H37Rv. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [5]. Использовали обогащенную жидкую питательную среду Дюбо («Difco»).

**Оценка эффективности препаратов**

Влияние препаратов на рост штамма микобактерий изучали с помощью автоматической системы детекции роста Bactec MGIT 960 («BD», США). Суспензию микобактерий (500 мкл) инокулировали в 7.9 мл питательной среды. Конечная концентрация *M. tuberculosis* в образце составляла  $10^6$  КОЕ/мл. Анализировали по три повторности каждой пробы (концентрации), включая контрольные пробы без препарата. Антимикобактериальное действие препаратов оценивали методом пропорций в формате TB Exist [6]. При тестировании этим методом сравнивают рост микобактерий, культивируемых с анализируемым препаратом, и рост контрольной культуры, разведенной в 100 раз по сравнению с опытной. Культура считается чувствительной (а соединение действующим) к такой концентрации препарата, при которой показатели роста в опыте не превышали 100 относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) при достижении 400 ОЕФ в контроле. Кроме того, методом абсолютных концентраций оценивали влияние соединений в концентрациях, меньших минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на жизнеспособность микобактерий, по задержке роста культуры по сравнению с контролем. Рост культуры определяли автоматически с интервалом 1 ч, регистрировали с помощью программного обеспечения Epicenter («BD», США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

За последние десятилетия карбоциклические нуклеозиды стали объектом интенсивного изучения. Оказалось, что они обладают биологической активностью, в частности противовирусной и противоопухолевой

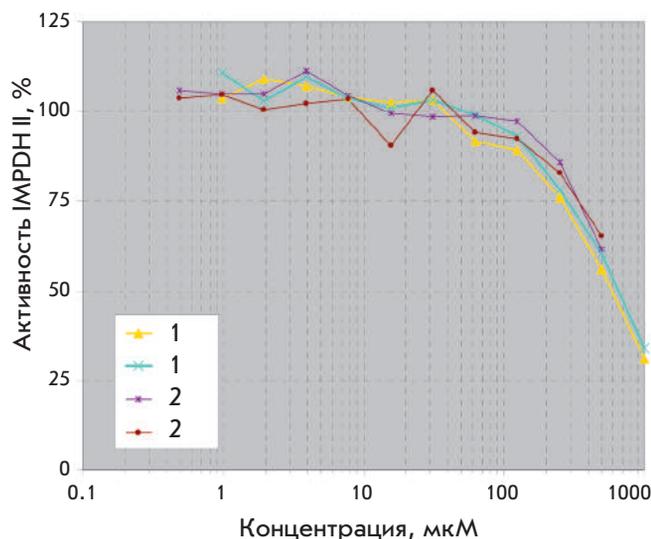


**Схема.** а – Этанол (абс.),  $K_2CO_3$ , кипячение 1 ч;  
 б – NaH,  $TosOCH_2P(O)(OC_2H_5)OH$ ,  $Cs_2CO_3$ , ДМФА;  
 в –  $OsO_4$ , NMMO, диоксан; г –  $(CH_3)_3SiBr$ , ДМФА

[7]. Такие нуклеозиды узнаются многими ферментами и рецепторам, поскольку их структура сходна со структурой природных нуклеозидов, и при этом обладают повышенной стабильностью к расщеплению C–N-связи фосфорилазами и гидролазами.

В качестве карбоциклического фрагмента в соединениях **1** и **2** используется гидроксциклопентен. Аналоги с этим фрагментом называются 5'-норкарбоциклическими нуклеозидами. Замена первичного 5'-гидроксильного остатка на вторичный 4'-гидроксил приводит к понижению токсичности за счет потери субстратных свойств по отношению к клеточным киназам. Принимая во внимание невозможность внутриклеточного фосфорилирования 5'-норкарбоциклических нуклеозидов, мы синтезировали метиленфосфонаты 9-(4'-гидроксициклопентен-1'-ил)гипоксантина и 9-(4',2',3'-тригидроксициклопент-1'-ил)гипоксантина (схема). Ранее было показано, что изостерные фосфонаты такого типа имитируют соответствующие монофосфаты, но существенно более устойчивы к действию гидролизующих и дефосфорилирующих ферментов [8].

9-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-хлорпурин **3** получали конденсацией эпоксициклопентена и 6-хлорпурина по ранее описанной методике [4]. Кипячение в этаноле соединения **3** приводило к образованию эфира **4**, из которого реакцией с этиловыми эфирами тозилосиметилфосфоновой или йодметил-



**Рис. 2.** Ингибирование активности IMPDH II в зависимости от концентрации соединений **1** и **2**

фосфоновой кислот получали соединение **5**. Эфир **5** гидролизовали до 9-(4'-фосфонилметиленокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантина **1** избытком триметилбромсилана. Для получения монофосфоната **2** двойную связь соединения **5** окисляли тетраоксидом осмия в присутствии N-метилморфолиноксида, а затем удаляли этильные группы соединения **6** в присутствии триметилбромсилана (схема). Целевые продукты **1** и **2** очищали при помощи колоночной хроматографии на ионообменной смоле DEAE-Toyorearl в линейном градиенте концентраций  $NH_4HCO_3$ . Последующую очистку от солей осуществляли на обращенно-фазовом силикагеле LiChroprep RP-18. Выход составил 84 и 81% соответственно.

Соединения **1** и **2** были проверены в качестве ингибиторов IMPDH II человека (рис. 2).

Как видно из рис. 2, карбоциклический аналог **1** в концентрации 500 мкМ подавлял активность фермента на 50% ( $K_i$  474 мкМ), а соединение **2** на 35–39% ( $K_i$  975 мкМ). В качестве контроля использовали монофосфат рибавирина, который ингибировал активность фермента на 50% в концентрации 2 мкМ, величина  $K_m$  природного субстрата IMP в данной системе составила 124.4 мкМ.

Также изучена способность монофосфонатов **1** и **2** ингибировать рост *M. tuberculosis*. Рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv под действием соединений **1** и **2** в концентрации 2–100 мкг/мл (5–320 мкМ) был таким же, как в контроле – начало роста культур зафиксировано на 7-й день, выход в стационарную фазу роста – на 17-й. Время активного деления культуры – 10 сут. Соединение **2** лишь в концентрации

200 мкг/мл (578 мкМ) приводило к несущественной (на 2 сут) задержке начала роста культуры по сравнению с контролем.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированные 9-(4'-фосфонометокси-2'-циклопентен-1'-ил)гипоксантин и 9-(4'-фосфонометокси-2',3'-дигидроксициклопент-1'-ил)гипоксантин являются слабыми ингибиторами IMPDH II человека. В концентрации 20–200 мкг/мл эти соединения практически не влияют на рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, что может быть связано как с трудностью их проникновения в микобактериальную клетку из-за особенностей строения ее клеточной стенки, так и с наличием у микобактерий альтернативных

путей синтеза, необходимых для жизнедеятельности соединений. Нельзя также исключить, что IMPDH *M. tuberculosis* менее чувствительна к тестируемым соединениям, чем IMPDH II человека. ●

*Авторы благодарят Л. Балакиреву и Н. Годарда из компании «NovoCib» (Франция, Лион) за биологические испытания синтезированных соединений с рекомбинантной IMPDH II человека.*

*Работа поддержана РФФИ (гранты № 11-04-12035-офи-м, 11-04-00603) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nair V., Shu Q. // *Antiviral. Chem. Chemotherapy*. 2007. V. 18. P. 245–258.
2. Shu Q., Nair V. // *Med. Res. Rev.* 2008. V. 28. № 2. P. 219–232.
3. Usha V., Hobrath J.V., Gurcha S.S., Reynolds R.C., Besra G.S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e33886.
4. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Shipitsin A.V., Karpenko I.L., Belanov E.F., Kukhanova M.K., Yasko M.V. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006. V. 71. P. 1107–1121.
5. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. // *Пробл. туберкулеза и болезни легких*. 2006. № 12. С. 43–48.
6. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. *MGIT procedure manual for Bactec MGIT 960 TB system*. Foundation for Innovative New Diagnostics, Geneva, Switzerland, 2006.
7. Matyugina E.S., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N. // *Russian Chemical Reviews*. 2012. V. 81. № 8. P. 729–746.
8. Wu T., Froeyen M., Kempeneers V., Pannecouque C., Wang J., Busson R., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 14. P. 5056–5065.

УДК 576.591

# Кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот

Ю. М. Евдокимов<sup>1\*</sup>, В. И. Саянов<sup>1</sup>, Е. И. Кац<sup>2</sup>, С. Г. Скуридин<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32<sup>2</sup>Институт теоретической физики им. Л.Д. Ландау РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 2

\*E-mail: yevdokim@eimb.ru

Поступила в редакцию 13.06.2012

**РЕФЕРАТ** Рассмотрено действие наночастиц золота на частицы холестерических жидкокристаллических дисперсий, сформированных из двухцепочечных молекул ДНК и поли(И)×поли(С). Показано, что наночастицы малого размера (~ 2 нм) индуцируют два разных процесса: (1) переход холестерической структуры частицы дисперсии в нематическую, сопровождаемый быстрым уменьшением амплитуды аномальной полосы в спектре кругового дихроизма, и (2) формирование кластеров из наночастиц золота в «свободном пространстве» между соседними молекулами ДНК, фиксированными в структуре квазинематических слоев частиц дисперсии, сопровождаемое медленным развитием полосы поверхностного плазмонного резонанса. Изучено действие разных факторов на эти процессы. Высказаны предположения о возможных механизмах фиксации наночастиц золота между соседними молекулами нуклеиновых кислот в квазинематических слоях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ДНК, поли(И)×поли(С), жидкокристаллические дисперсии нуклеиновых кислот, наночастицы золота, круговой дихроизм, поверхностный плазмонный резонанс, цитотоксичность наночастиц.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДАУ – дауномицин; КД – круговой дихроизм; наночастицы Au (нано-Au) – наночастицы золота; ППР – поверхностный плазмонный резонанс; ПЭГ – полиэтиленгликоль; УФ-область – ультрафиолетовая область; ХЖКД – холестерическая жидкокристаллическая дисперсия.

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что имманентное свойство наночастиц металлов и окислов металлов – их специфические свойства, зависящие от размера. Эти свойства наночастиц заметно отличаются от свойств, характерных для «массивного» образца исходного материала. Одним из наиболее ярких примеров, иллюстрирующих существование таких различий служат наноразмерные частицы золота (Au), используемые как в научных, так и в прикладных целях [1], в частности для диагностики и терапии некоторых заболеваний [2, 3]. Хотя цитотоксичность наночастиц Au *in vitro* и *in vivo* изучали несколько исследовательских групп, информация о биологических эффектах, вызываемых наночастицами Au, достаточно противоречива [4, 5]. Не исключено, что это связано с изучением действия наночастиц в разных биологических системах, и в этом случае сопоставление механизмов их действия представляет сложную задачу.

Получены данные [3, 6], позволившие высказать предположение, согласно которому действие на-

наночастиц Au на пространственно организованные структуры ДНК *in vitro* и *in vivo* сходно с действием молекул, обладающих мутагенной активностью. Одной из структур, моделирующей некоторые пространственные особенности ДНК в составе биологических объектов, являются, как известно [7], частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) ДНК. Действительно, физико-химические особенности частиц ХЖКД ДНК отражают некоторые свойства этих макромолекул, присущие хромосомам простейших (например, хромосомы *Dinoflagellate* и т.д.) и ДНК-содержащим бактериофагам [8–10].

Следовательно, ХЖКД ДНК является системой, интересной как с нанотехнологической, так и с биотехнологической точки зрения.

При изучении действия наночастиц Au на различные биологические макромолекулы и системы следует иметь в виду несколько обстоятельств. Наночастицы Au, особенно малого размера, склонны как к самопроизвольной агрегации в водно-солевых растворах [1, 11, 12], так и к образованию различно-

го рода комплексов и агрегатов с компонентами этих растворов и растворенными в них макромолекулами [13–16]. Такой процесс, сопровождаемый сближением соседних наночастиц Au, приводит не только к усилению так называемой полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР), характерной для единичных наночастиц Au, но и к возбуждению коллективных колебаний электронной системы и взаимодействию между соседними «плазмонами» (к «перекрыванию плазмонов»), сопровождаемому [1, 17, 18] смещением полосы ППР в красную или синюю область спектра поглощения в зависимости от ряда параметров (расстояние между частицами, размер и форма образующихся агрегатов, диэлектрическая постоянная среды [19, 20], наличие «прослоек» между соседними наночастицами Au [21, 22] и т.д.). Очевидно, что образование таких комплексов (и возможная агрегация соседних наночастиц Au) зависит от концентрации и заряда наночастиц Au, их размера, а также от свойств компонентов растворителя. Это означает, что при исследовании взаимодействия наночастиц Au с молекулами биополимеров необходимо проводить контрольные эксперименты, доказывающие, прежде всего, отсутствие «паразитных» оптических эффектов, обусловленных образованием неспецифических агрегатов между наночастицами Au и компонентами растворителя в используемых условиях.

Поэтому цель настоящей работы состояла не только в доказательстве отсутствия неспецифических агрегатов между наночастицами Au и компонентами растворителя, но и в анализе взаимодействия наночастиц Au с двухцепочечными молекулами ДНК, фиксированными в пространственной структуре частиц ХЖКД, образующейся в результате фазового исключения молекул ДНК из водно-полимерных растворов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растворы коллоидного золота (гидрозоли), содержащие сферические наночастицы разного размера. Наночастицы Au были синтезированы по ранее описанным методикам [23–25]. Первый гидрозоль был получен по методике [23] и содержал наночастицы Au со средним диаметром около 15 нм. Второй гидрозоль, содержащий наночастицы Au размером 5.5 нм, синтезирован согласно [24]. Наконец, третий гидрозоль с квазиметаллическими наночастицами Au размером 2–3 нм получен как описано в работе [25]. Средний размер наночастиц Au в исходных растворах оценивали при помощи динамического светорассеяния и электронной микроскопии. Численная концентрация наночастиц Au в первом, втором и третьем гидрозолях составляла  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  и  $10^{15}$  частиц/см<sup>3</sup> соответственно.

Наночастицы Au несли отрицательные заряды, их  $\xi$ -потенциалы составляли: для частиц размером 2–3 нм –  $-18 \pm 7$  мВ (сразу после синтеза),  $-25 \pm 5$  мВ (спустя 2 дня после синтеза),  $-38 \pm 5$  мВ (спустя 9 месяцев после синтеза); для частиц размером 5 нм –  $-32 \pm 4$  мВ; для частиц размером 15 нм –  $-44 \pm 3$  мВ.

Исходные растворы наночастиц Au хранили в холодильнике при 4 °С в светонепроницаемом контейнере и использовали через 2.5 месяца после синтеза.

Использовали дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат ДНК из тимуса крупного рогатого скота («Sigma», США) с молекулярной массой  $(0.3–0.7) \times 10^6$  Да. Препарат синтетического двухцепочечного полирибонуклеотида поли(И)×поли(С) («Sigma», США; lot 023K4032) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию ДНК и поли(И)×поли(С) в водно-солевых растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известными значениями молярных коэффициентов поглощения ( $\epsilon_{\max} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в случае ДНК и  $\epsilon_{\max} = 4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в случае поли(И)×поли(С)).

Препараты полиэтиленгликоля (ПЭГ; «Serva», Германия; молекулярная масса 4000 Да) использовали без дополнительной очистки.

Спектры поглощения регистрировали спектрофотометрически (Cary 100 Scan, «Varian», США), а спектры кругового дихроизма (КД) – при помощи портативного дихрометра СКД-2. Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивностей поглощения лево- и правополяризованного света ( $\Delta A$ ;  $\Delta A = (A_L - A_R)$ ) от длины волны ( $\lambda$ ).

ХЖКД ДНК в ПЭГ-содержащих водно-солевых растворах готовили в соответствии с методикой, описанной ранее [7].

Учитывая, что взаимодействие наночастиц Au с молекулами биополимеров (нуклеиновых кислот и белков) сопровождается изменением оптических свойств этих наночастиц, провели ряд контрольных опытов.

Как отмечено во «Введении», прежде всего, нужно было ответить на ряд вопросов, относящихся к поведению отрицательно заряженных наночастиц Au малого размера в использованных нами условиях. Могут ли такие наночастицы Au:

- образовывать агрегаты в использованных нами растворах низкой или высокой ионной силы;
- взаимодействовать (образовывать комплексы) с нейтральным полимером (ПЭГ), используемым для формирования частиц ХЖКД из молекул ДНК;
- действовать на молекулы одноцепочечных нуклеиновых кислот в растворах низкой или высокой ионной силы;

г) действовать на молекулы двухцепочечной ДНК в условиях, исключающих образование дисперсии в водно-солевом растворе ПЭГ.

### Спектры поглощения

На *рис. 1А* сопоставлены спектры поглощения наночастиц Au, зарегистрированные в разные промежутки времени после добавления в раствор ПЭГ ( $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл). Видно, что спектр поглощения характеризуется плохо выраженной полосой (I) при  $\lambda \sim 500$  нм и широкой полосой в коротковолновой области спектра, обусловленной переходами электронов как между d-орбиталями, так и гибридованными s-p-орбиталями Au [26]. Постоянство амплитуды полосы при  $\lambda \sim 500$  нм в спектре поглощения, отсутствие красного или синего смещения этой полосы однозначно свидетельствуют о том, что отрицательно заряженные наночастицы Au малого размера не образуют агрегатов вблизи поверхности молекул ПЭГ в использованных нами условиях.

На *рис. 1В* представлены спектры поглощения, зарегистрированные в разные промежутки времени после добавления наночастиц Au к водно-солевому раствору одноцепочечного синтетического полинуклеотида – поли(А), а на *рис. 1В* – спектры поглощения после добавления наночастиц Au к водно-солевому раствору этого же биополимера, содержащему ПЭГ ( $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл). Видно, что в спектрах поглощения на *рис. 1В, В* присутствуют две полосы; полоса в видимой области спектра (I) соответствует наночастицам Au, полоса в УФ-области спектра (II) содержит вклад от поглощения хромофоров полинуклеотида. Положение этих полос и их максимумы не меняются во времени после добавления наночастиц Au в растворы.

На *рис. 1Г* показаны спектры поглощения наночастиц Au, зарегистрированные в разные промежутки времени после их добавления в водно-полимерный раствор ( $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл) низкой ионной силы, содержащий молекулы двухцепочечной ДНК. В спектре поглощения присутствуют две полосы; полоса в видимой области спектра (I) соответствует наночастицам Au, полоса в УФ-области спектра (II) – поглощению хромофоров ДНК. В использованных условиях (ионная сила – 0.001 и  $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл) фазовое исключение двухцепочечных молекул ДНК не происходит, и ХЖКД ДНК не образуется. В этих условиях не наблюдается изменений в амплитудах обеих полос.

### Спектры кругового дихроизма

Регистрация спектров КД водно-солевых растворов, содержащих линейные, двухцепочечные молекулы ДНК или поли(И)×поли(С), свидетельствует

об отсутствии оптических изменений при обработке этих растворов наночастицами Au (спектры не приведены).

Таким образом, отсутствие заметных изменений в величине амплитуды и положении полосы при  $\lambda \sim 500$  нм в спектрах поглощения, представленных на *рис. 1А*, а также в спектрах КД, свидетельствует о том, что отрицательно заряженные наночастицы Au малого размера в использованных нами условиях не образуют агрегатов в водных растворах низкой или высокой ионной силы, а также агрегатов вблизи молекул ПЭГ. Кроме того, в условиях, при которых фазовое исключение молекул одноцепочечного полинуклеотида (*рис. 1В*) или двухцепочечной ДНК (*рис. 1Г*) не происходит, и дисперсии из молекул биополимеров не образуются [7], не наблюдается изменений амплитуд полос, характеризующих оптические свойства азотистых оснований биополимеров или наночастиц Au малого размера.

С учетом результатов контрольных опытов изучено действие наночастиц Au малого размера на двухцепочечные молекулы ДНК и поли(И)×поли(С), фиксированные в пространственной структуре частиц ХЖКД.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде чем анализировать действие наночастиц Au на двухцепочечные молекулы ДНК и поли(И)×поли(С), фиксированные в пространственной структуре частиц ХЖКД, необходимо сделать несколько пояснений, касающихся структуры исходных частиц жидкокристаллической дисперсии. В физико-химическом смысле каждая частица дисперсии представляет собой «каплю» концентрированного раствора ДНК, структура и свойства которой определяются величиной осмотического давления раствора [7]. «Каплю» нельзя «взять в руки» или иммобилизовать на подложке, поскольку в отсутствие осмотического давления растворителя структура «капли» изменится и молекулы ДНК перейдут из конденсированного в изотропное состояние. Каждая частица ХЖКД образована из двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот, формирующих соседние, так называемые квазинематические слои [7]. Некоторые особенности квазинематического слоя из упорядоченных соседних двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот (в частности, ДНК) иллюстрирует *рис. 2*. При фазовом исключении молекулы водорастворимого полимера (ПЭГ) не входят в состав частиц дисперсии, а следовательно, и квазинематического слоя. Между соседними молекулами ДНК как в одном слое, так и между молекулами ДНК в соседних слоях существует «свободное пространство». Рас-

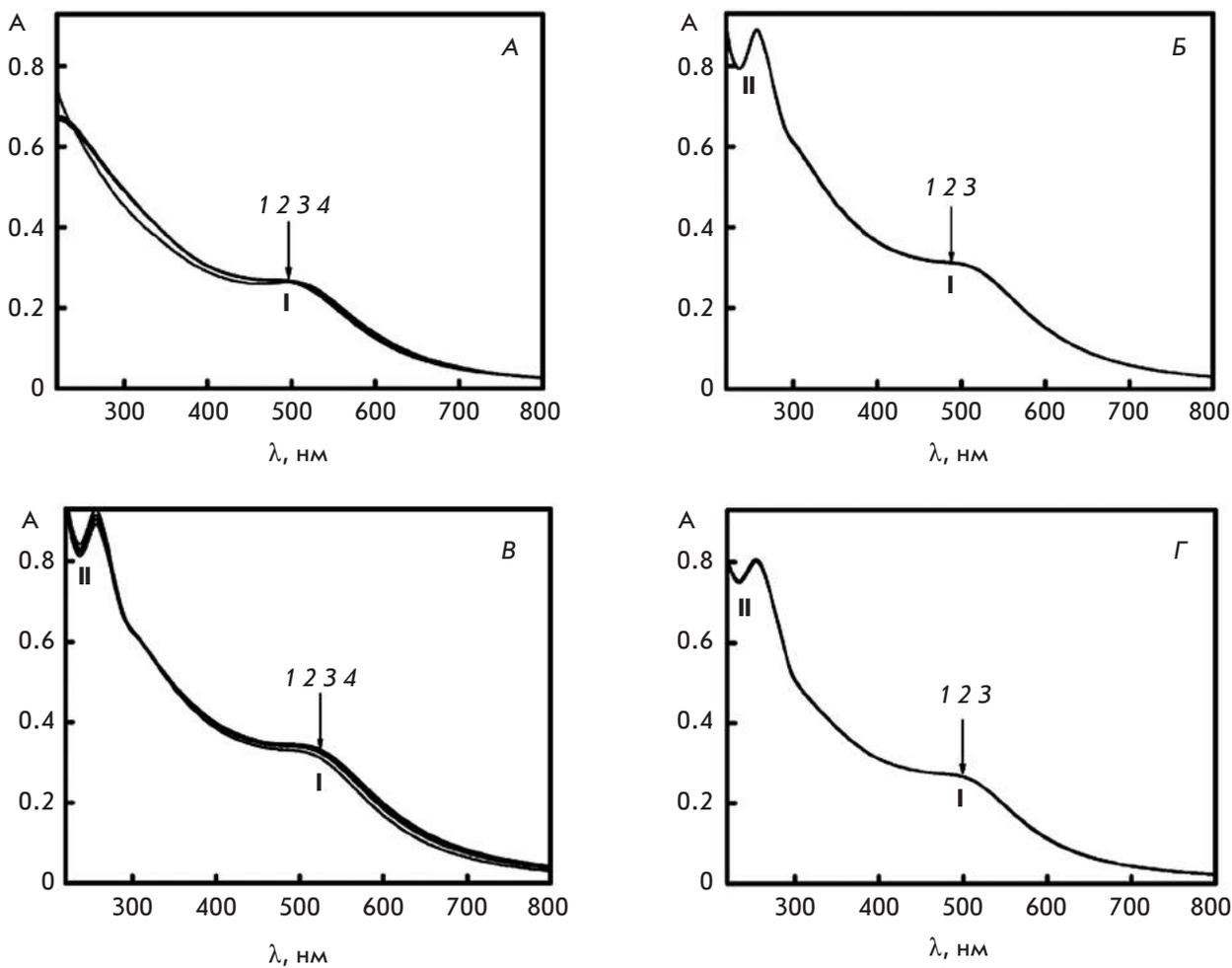


Рис. 1. Спектры поглощения наночастиц Au в разных условиях.

А – Спектры поглощения наночастиц Au в водно-солевом растворе ПЭГ: 1 – 1 мин; 2 – 6 мин; 3 – 17 мин; 4 – 280 мин обработки наночастицами Au водно-солевого раствора ПЭГ.  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ;  $0.27 \text{ M NaCl} + 1.78 \times 10^{-3} \text{ M Na}^+$ -фосфатный буфер;  $C_{\text{нано-Au}} = 0.82 \times 10^{14} \text{ частиц/мл}$ .

Б – Спектры поглощения наночастиц Au в водно-солевом растворе одноцепочечного полинуклеотида поли(А): 1 – 1 мин; 2 – 17 мин; 3 – 30 мин обработки наночастицами Au водно-солевого раствора поли(А).  $C_{\text{поли(А)}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А.

В – Спектры поглощения наночастиц Au в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе одноцепочечного полинуклеотида поли(А): 1 – 1 мин; 2 – 7 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин обработки наночастицами Au ПЭГ-содержащего водно-солевого раствора поли(А).  $C_{\text{поли(А)}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А.

Г – Спектры поглощения наночастиц Au в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе ДНК низкой ионной силы: 1 – 1 мин; 2 – 17 мин; 3 – 180 мин обработки наночастицами Au ПЭГ-содержащего водно-солевого раствора ДНК.  $C_{\text{ДНК}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ;  $0.0009 \text{ M NaCl}$ ; концентрация наночастиц Au как на рис. 1А

стояние между соседними молекулами ДНК в слое (d) может меняться в пределах от 2.5 до 5.0 нм в зависимости от осмотического давления раствора. (В использованных нами условиях ( $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  и  $170 \text{ мг/мл}$ ) расстояние между молекулами ДНК, определяемое в результате рентгенографическо-

го анализа фаз, полученных при низкоскоростном осаждении исходных частиц ХЖКД ДНК [7], составляло 3.6 и 3.2 нм соответственно.) Молекулы ДНК, упорядоченные в слое, сохраняют почти все диффузионные степени свободы. Анизотропные свойства молекул ДНК приводят к тому, что каждый после-

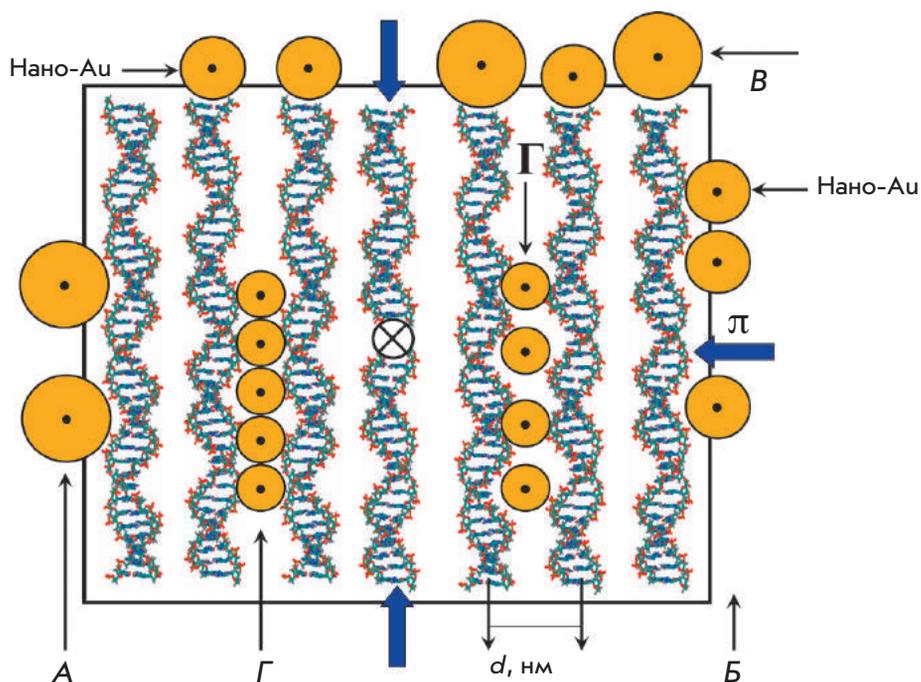


Рис. 2. Гипотетическая схема расположения наночастиц Au разного размера (А–Г) вблизи молекул ДНК, образующих квазинематический слой. Рамка и широкие стрелки соответствуют осмотическому давлению ( $\pi$ ) ПЭГ-содержащего раствора;  $d$  – расстояние между осями соседних молекул ДНК

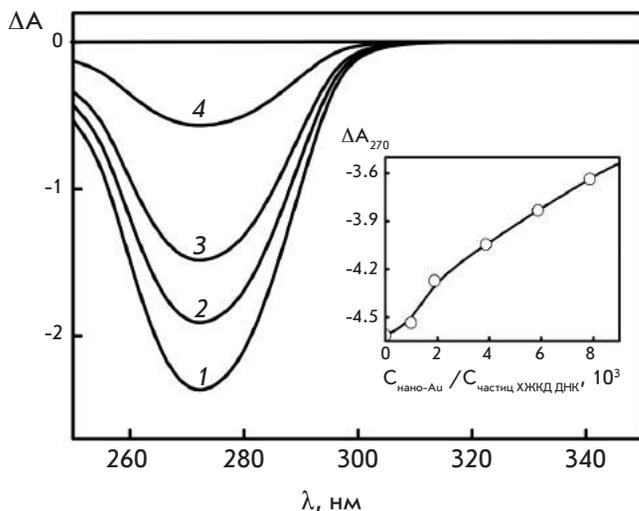
дующий квазинематический слой поворачивается на определенный угол (около  $0.1^\circ$  [7]) по отношению к предыдущему. В результате поворота формируется пространственно закрученная (холестерическая) структура частицы жидкокристаллической дисперсии. Возникновение этой структуры легко детектируется по аномальной оптической активности, проявляемой, в частности, в виде характерной интенсивной полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров (азотистых оснований) ДНК. Высокая локальная концентрация ДНК и упорядоченное расположение этих макромолекул в слое создают условия для быстрого взаимодействия молекул различных низкомолекулярных соединений («гостей») с молекулами ДНК (интеркаляция между парами оснований, фиксация в бороздках на поверхности молекул и т.д.). Происходящие при таком взаимодействии искажения вторичной структуры ДНК влияют не только на свойства всех квазинематических слоев, но и на характер взаимодействия между ними, а следовательно, и на структурные особенности любой частицы ХЖКД и ее свойства. (Поскольку свойства квазинематического слоя (слоев) определяют физико-химические свойства частиц ХЖКД ДНК, мы будем использовать именно этот термин при изложении дальнейших результатов работы.) Наконец, полное разделение цепей двухцепочечных молекул ДНК в квазинематическом слое и их сворачивание в единичные статистические клубки невозможно по стерическим причинам [27, 28].

Рассмотренные особенности квазинематического слоя позволяют высказать предположение о возможных механизмах фиксации наночастиц Au («гостей») вблизи двухцепочечных молекул ДНК квазинематического слоя (рис. 2).

Во-первых, наночастицы Au любого размера (рис. 2А–В) могут взаимодействовать как с «поверхностными» молекулами ДНК, так и с парами оснований концевых групп молекул ДНК квазинематических слоев, образуя с ними комплексы (ансамбли) [13, 29–31].

Во-вторых, не исключено, что наночастицы Au, размер которых сопоставим с расстоянием между молекулами ДНК в квазинематическом слое, могут диффундировать внутрь слоев (рис. 2Г), взаимодействовать с соседними молекулами ДНК одного квазинематического слоя или соседних квазинематических слоев и образовывать линейные кластеры.

Можно предполагать, что связывание даже небольшого числа отрицательно заряженных наночастиц Au с молекулами ДНК (особенно с концевыми группами этих молекул) приводит к формированию своеобразных диполей. (Следует отметить, что для этого не требуется проникновения наночастиц Au внутрь квазинематического слоя.) Диполи из соседних комплексов (ДНК–Au) в структуре квазинематического слоя, как и сами слои, будут стремиться к параллельному расположению, что, в конечном счете, может индуцировать изменение спиральной закрутки соседних квазинематических слоев из молекул ДНК.



**Рис. 3.** Спектры КД ХЖКД ДНК, обработанной наночастицами Au (2 нм): 1 –  $C_{\text{нано-Au}} = 0$ ; 2 –  $C_{\text{нано-Au}} = 0.07 \times 10^{14}$  частиц/мл; 3 –  $C_{\text{нано-Au}} = 0.26 \times 10^{14}$  частиц/мл; 4 –  $C_{\text{нано-Au}} = 0.82 \times 10^{14}$  частиц/мл. (Время обработки ХЖКД ДНК наночастицами Au – 3 ч.  $C_{\text{ДНК}} = 9$  мкг/мл;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл; буфер как на рис. 1А.  $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-3}$  оптических единиц;  $L = 1$  см.) На вставке в качестве примера приведена зависимость величины  $\Delta A_{270}$  от соотношения  $C_{\text{нано-Au}} / C_{\text{частиц ХЖКД ДНК}}$  в растворе ( $C_{\text{ПЭГ}} = 170$  мг/мл), обеспечивающем максимальную аномальную оптическую активность частиц ХЖКД ДНК

В принципе, угол закрутки между этими слоями ( $\sim 0.1^\circ$  [7]) может обратиться в ноль, что эквивалентно раскрутке холестерической спиральной структуры, и этот процесс будет проявляться исчезновением аномальной полосы в спектре КД частиц жидкокристаллической дисперсии.

Очевидно, что даже небольшое число отрицательно заряженных наночастиц Au, не оказывая существенного влияния на силы (стерические и т.д.), определяющие стремление соседних молекул ДНК к параллельному расположению, может вызывать изменение величины вкладов (в частности, анизотропного вклада в Ван-дер-Ваальсово взаимодействие), определяющих спиральную закрутку соседних квазинематических слоев из молекул ДНК. В этом случае спиральная закрутка соседних квазинематических слоев будет нарушаться, и угол закрутки между этими слоями ( $\sim 0.1^\circ$  [7]) может обращаться в ноль, что эквивалентно раскрутке холестерической спиральной структуры, сопровождаемой исчезновением аномальной полосы в спектре КД частиц жидкокристаллической дисперсии.

Следовательно, можно ожидать, что, если отрицательно заряженные наночастицы Au тем или иным способом взаимодействуют с двухцепочечными молекулами ДНК в частицах ХЖКД, то такое взаимодействие будет сопровождаться, прежде всего, изменением характерной для этой дисперсии аномальной оптической активности.

Не исключено также, что при определенном расположении соседних наночастиц Au вблизи молекул ДНК взаимодействие между этими наночастицами может привести к появлению полосы поверхностного плазмонного резонанса в спектре поглощения [1, 13, 19].

### Изменение кругового дихроизма при действии наночастиц Au на частицы ХЖКД ДНК

Обработка частиц ХЖКД ДНК наночастицами Au, как показано на рис. 3, приводит к уменьшению амплитуды аномальной отрицательной полосы в спектре КД. (Отрицательный знак полосы свидетельствует о том, что правоспиральные молекулы двухцепочечной ДНК образуют частицы ХЖКД, имеющие левую закрутку пространственной спиральной структуры [7].)

Под действием наночастиц Au амплитуда аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК уменьшается за весьма малый промежуток времени. При этом, чем выше концентрация наночастиц Au в растворе, тем более заметно уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД частиц ХЖКД ДНК.

Следует отметить, что заметное уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК начинается с некоторой критической концентрации наночастиц Au в растворе (рис. 3, вставка), составляющей около 1000 наночастиц Au на одну частицу ХЖКД ДНК.

(Аналогичные данные, характеризующие уменьшение аномальной полосы в спектре КД ХЖКД, образованной синтетическими двухцепочечными молекулами поли(И)×поли(С), при ее обработке наночастицами Au приведены в работе [6]. Следует отметить, что появление положительной полосы в спектре КД этой ХЖКД свидетельствует о том, что правоспиральные молекулы двухцепочечной поли(И)×поли(С) образуют частицы ХЖКД, имеющие правую закрутку пространственной спиральной структуры.)

Быстрое уменьшение амплитуды полосы в спектре КД ХЖКД ДНК зависит от размера наночастиц Au. В частности, если диаметр наночастиц Au равен 2 нм, то амплитуда аномальной полосы в спектре КД уменьшается на 75%, а при использовании наночастиц диаметром 15 нм – только на 20% [32].

Уменьшение амплитуды полосы в спектре КД ХЖКД ДНК зависит также и от температуры рас-

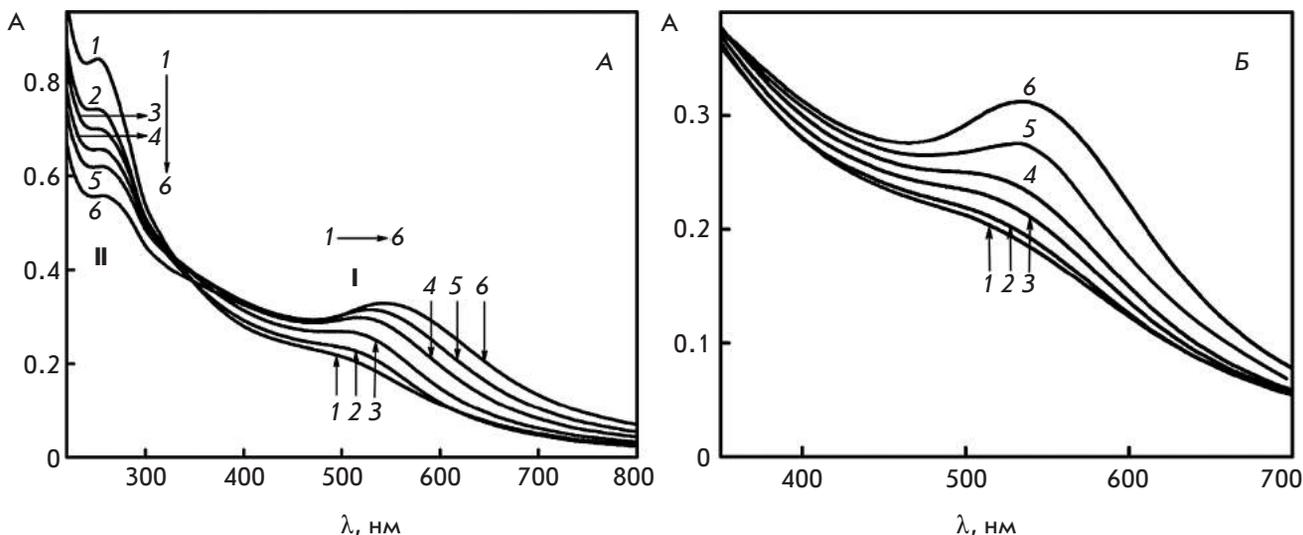


Рис. 4. Спектры поглощения ХЖКД ДНК (А) и ХЖКД поли(И)×поли(С) (Б), обработанных наночастицами Au в течение разных промежутков времени. А – Обработка в течение 0, 1, 8, 21, 36 и 100 мин (1–6 соответственно). Б – Обработка в течение 2, 30, 50, 85, 115 и 256 мин (1–6 соответственно).  $C_{\text{ДНК}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{поли(И)×поли(С)}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{пэг}} = 150 \text{ мг/мл}$ ; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А

творя, в котором частицы этой дисперсии обрабатывают наночастицами Au [32].

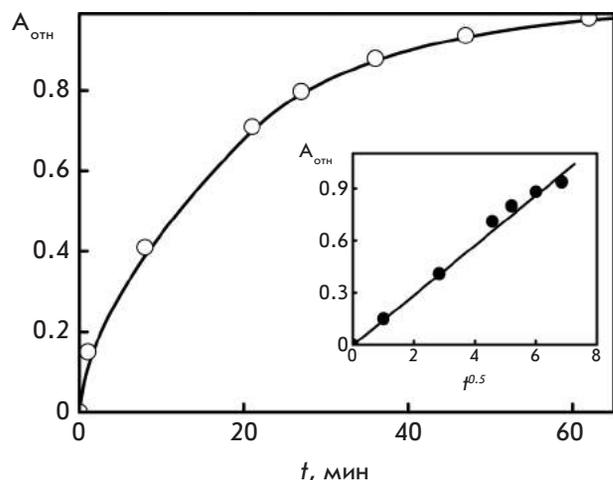
Схема, представленная на рис. 2, в сочетании с различиями в эффективности изменений в спектре КД в случае наночастиц разного размера позволяет предполагать, что уменьшение аномальной оптической активности частиц ХЖКД ДНК или ХЖКД поли(И)×поли(С) может быть следствием двух причин. Во-первых, единичные наночастицы Au любого размера (рис. 2А–В) могут взаимодействовать с «поверхностными» молекулами ДНК, образуя с ними комплексы или линейные ансамбли (кластеры). При этом наночастицы Au малого размера могут располагаться в бороздках «поверхностных» молекул ДНК [31, 33] или образовывать комплексы с парами азотистых оснований ДНК (в частности, с атомами N7 пуринов [34–37]). Во-вторых, наночастицы Au, размер которых сопоставим с расстоянием между молекулами ДНК в квазинематических слоях, могут диффундировать внутрь слоев и взаимодействовать с молекулами ДНК.

Здесь важно отметить два обстоятельства. 1) Уже в первых экспериментах [13, 38, 39] было обнаружено, что наночастицы Au могут образовывать ансамбли вблизи поверхности линейных одноцепочечных молекул ДНК. Позднее было показано, что образование ансамблей из наночастиц Au сопровождается формированием планарных суперструктур, состоящих из повторяющихся двухцепочечных молекул ДНК и наночастиц Au. Эти результаты однозначно показы-

вают, что молекулы ДНК после взаимодействия с наночастицами Au стремятся к образованию планарных суперструктур [30, 39, 40], несмотря на наличие анизотропных свойств у исходных молекул ДНК [7].

2) В случае частиц ХЖКД, образованных двухцепочечными молекулами ДНК, формирование ансамблей даже из небольшого числа наночастиц Au на «поверхностных» молекулах ДНК или вблизи молекул ДНК в квазинематических слоях будет приводить к изменению характера взаимодействия соседних квазинематических слоев. В результате этого спиральная закрутка соседних слоев может исчезнуть, т.е. будет происходить раскручивание пространственной спиральной структуры частиц ХЖКД. С учетом образования планарных структур, рассмотренного выше, можно сказать, что в случае частиц ХЖКД наночастицы Au инициируют параллельное, а не спиральное расположение соседних квазинематических слоев молекул ДНК.

Независимо от названных причин сочетание контрольных опытов (рис. 1) и полученных результатов (рис. 3) позволяет говорить о том, что наночастицы Au действуют именно на молекулы двухцепочечной ДНК, фиксированные в частицах ХЖКД. При этом быстрое уменьшение аномальной полосы в спектре КД может быть обусловлено связыванием достаточно малого числа наночастиц Au с молекулами ДНК в частицах ХЖКД. Этот процесс сопровождается нарушением спирального характера упорядочения соседних квазинематических слоев, т.е. наночастицы



**Рис. 5.** Зависимость амплитуды полосы ППР ( $\lambda = 550$  нм) наночастиц Au при их взаимодействии с ХЖКД ДНК от времени.  $C_{\text{ДНК}} = 9$  мкг/мл;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А. На вставке представлена зависимость амплитуды полосы ППР ( $\lambda = 550$  нм) наночастиц Au при их взаимодействии с ХЖКД ДНК от величины  $t^{0.5}$  ( $t$  – время, мин)

Au индуцируют переход, сходный с известным переходом холестерик  $\rightarrow$  нематик [7].

Таким образом, изменения в спектрах КД ХЖКД ДНК (или ХЖКД поли(И) $\times$ поли(С)) показывают, что наночастицы Au разного размера могут с разной эффективностью взаимодействовать с двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот или синтетических полинуклеотидов в составе частиц ХЖКД, хотя многие детали механизма этого взаимодействия остаются неясными.

### Изменение спектров поглощения при действии наночастиц Au на частицы ХЖКД ДНК

Как известно, анализ спектров поглощения наночастиц Au открывает дорогу для оценки размеров ансамблей, образуемых этими частицами в разных условиях [41–44].

При обработке частиц ХЖКД ДНК наночастицами Au малого размера наблюдаются заметные изменения как в видимой, так и в УФ-областях спектра (рис. 4А). Такая обработка сопровождается прежде всего изменением полосы (I) при 505 нм (полоса ППР) [41, 42]. На рис. 4Б представлены данные, полученные при обработке наночастицами Au ХЖКД, образованной молекулами поли(И) $\times$ поли(С), для частиц которой характерна не левая, а правая закрутка пространственной структуры. Видно, что и в этом случае обработка наночастицами Au сопровождается развитием плазмонного эффекта.

Появление полосы ППР отвечает за синевато-фиолетовую окраску раствора, содержащего ХЖКД ДНК или ХЖКД поли(И) $\times$ поли(С) и обработанного наночастицами Au. (Как показывают контрольные опыты (рис. 1), при  $\sim 505$  нм полоса плохо выражена в спектре поглощения наночастиц Au и практически не меняется при изменении свойств растворителя.) Интенсивность полосы ППР постепенно увеличивается во времени и ее максимум смещается от  $\lambda \sim 505$  до  $\sim 550$  нм. При этом амплитуда полосы (II) в УФ-области спектра, соответствующая поглощению хромофоров ДНК, уменьшается со временем. (Следует добавить, что согласно теоретическим расчетам [45] аналогичные изменения полос (I) и (II) в спектре поглощения отвечают за увеличение объемной доли наночастиц Au в ансамбле, образуемом из этих частиц.)

Характерно, что обработка частиц ХЖКД ДНК наночастицами Au размером 5 и 15 нм не сопровождается изменениями спектров поглощения этих наночастиц. Это дает основание предполагать, что в механизмах действия наночастиц Au малого и большого размера на частицы ХЖКД ДНК существуют заметные различия. Действительно, если вернуться к схеме, приведенной на рис. 2, то можно видеть, что наночастицы Au любого размера (А–В) могут располагаться вблизи «поверхностных» молекул ДНК квазинематического слоя, образуя линейные ансамбли. Формирование таких ансамблей даже из небольшого числа наночастиц Au может сопровождаться усилением полосы ППР [1].

Важно отметить, что прямой контакт между соседними наночастицами Au не обязателен для появления плазмонного эффекта, и плазмонный эффект можно наблюдать до тех пор, пока расстояние между соседними наночастицами меньше длины волны падающего излучения [1].

Отсутствие изменений в спектре поглощения частиц ХЖКД при их обработке наночастицами Au размером 5 и 15 нм в сочетании со схемой, приведенной на рис. 2, позволяет предполагать, что, кроме известного упорядочения наночастиц Au вблизи одноцепочечных или линейных двухцепочечных молекул ДНК [29–31, 39, 40], существует какой-то другой механизм расположения наночастиц Au малого размера в частицах ХЖКД ДНК.

Процесс развития полосы ППР при обработке ХЖКД ДНК наночастицами Au завершается в течение  $\sim 100$  мин (рис. 5), после чего наступает его насыщение. При этом между амплитудой полосы ППР (до момента насыщения) и величиной  $t^{0.5}$  сохраняется прямая пропорциональная зависимость. Если считать, что амплитуда полосы ППР связана с концентрацией наночастиц Au в образующемся ансамбле, то зависимость, приведенная на вставке (рис. 5), от-

ражает диффузию наночастиц Au [46] в квазинематические слои частиц ХЖКД.

На рис. 6 (вставка) показана зависимость положения максимума полосы ППР от размера сферических наночастиц Au, построенная на основании усреднения опубликованных данных [40–43]. Сопоставление результатов, приведенных на рис. 4, с этой зависимостью показывает, что размер наночастиц Au после их связывания с частицами ХЖКД ДНК мог бы увеличиться от 2 до ~ 60 нм. Хотя такая оценка не вполне корректна, поскольку данная зависимость характеризует свойства сферических наночастиц Au, тем не менее, ее можно использовать при сравнительной оценке размеров наночастиц Au, образующихся в разных условиях.

Приведенные в работе [6] результаты, характеризующие малоугловое рассеяние рентгеновых лучей на фазах, сформированных из частиц ХЖКД ДНК, обработанных наночастицами Au, позволяют более точно оценить размер. Эти результаты свидетельствуют о формировании в структуре таких частиц линейных кластеров наночастиц Au с максимальным размером 40 нм. При этом полоса ППР характеризуется максимумом при  $\lambda \sim 550$  нм [6]. Эти данные позволяют построить зависимость (рис. 6), которая связывает положение максимума полосы ППР с размером линейных кластеров наночастиц Au, т.е. она имеет прямое отношение к кластерам наночастиц Au, формируемым при взаимодействии наночастиц Au с частицами ХЖКД разных нуклеиновых кислот. Видно, что в случае ДНК реальный размер образующегося ансамбля (линейного кластера наночастиц Au) увеличивается от 2 до 40 нм. При обработке наночастицами Au ХЖКД поли(И)×поли(С) размер кластера наночастиц Au достигает 34 нм (эти данные выделены символом  $\blacklozenge$  на оси абсцисс рис. 6).

Следует отметить также, что в использованных нами экспериментальных условиях (отрицательный заряд наночастиц Au, высокая ионная сила растворов [47, 48] и т.д.) размер линейных кластеров из наночастиц Au никогда не превышал 40 нм.

Результаты, показанные на рис. 5 и 6, позволяют более точно проанализировать диффузионный механизм формирования кластеров наночастиц Au. Поскольку концентрация наночастиц Au «снаружи» частиц ХЖКД ДНК выше, чем «внутри» (т.е. между квазинематическими слоями), такой градиент концентраций вызывает появление диффузионного потока наночастиц Au. Поток остановится, когда концентрация «снаружи» и «внутри» частиц ХЖКД ДНК выравняется. Если характерное время такого выравнивания  $t$ , то размер кластера, образовавшегося из продиффундировавших наночастиц Au, растет как квадратный корень величины времени,

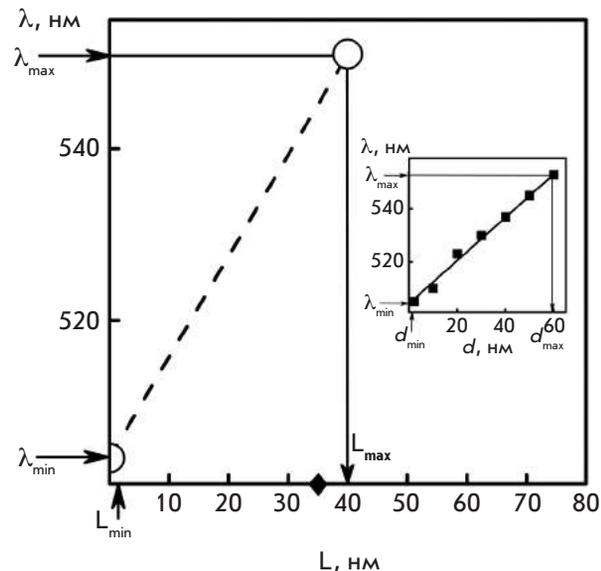


Рис. 6. Зависимость положения максимума полосы ППР от размера линейных кластеров наночастиц Au, образующихся в структуре частиц ХЖКД ДНК. Символ  $\blacklozenge$  на оси абсцисс – размер кластеров наночастиц Au, образующихся при их взаимодействии с частицами ХЖКД, сформированными из молекул двухцепочечного полирибонуклеотида поли(И)×поли(С). На вставке представлена зависимость положения максимума полосы ППР от размера сферических наночастиц Au (усредненные данные, приведенные в работах [40–43])

т.е. как  $t^{0.5}$ . Можно ожидать, что этому процессу будет препятствовать меньшая (по сравнению с наночастицами Au, свободно распределенных в растворе) величина трансляционной энтропии у наночастиц Au, сосредоточенных внутри кластера (т.е. в «свободном пространстве» между квазинематическими слоями). Поскольку энтропийный фактор пропорционален  $k_B T$ , то чем выше будет температура раствора, тем меньше должен быть размер кластеров из наночастиц Au, образующихся в частицах ХЖКД нуклеиновых кислот.

Таким образом, в нашем случае смещение положения полосы ППР связано не с увеличением истинного размера индивидуальных наночастиц Au, а с размером линейных кластеров из наночастиц Au в структуре частиц ХЖКД нуклеиновых кислот, образующихся в разных условиях. (Вопрос об оценке числа наночастиц Au в кластере на основании результатов оптических изменений остается открытым, поскольку положение максимума полосы ППР зависит от числа и расстояния между наночастицами Au в кластере, диэлектрической постоянной среды и других параметров [19].)

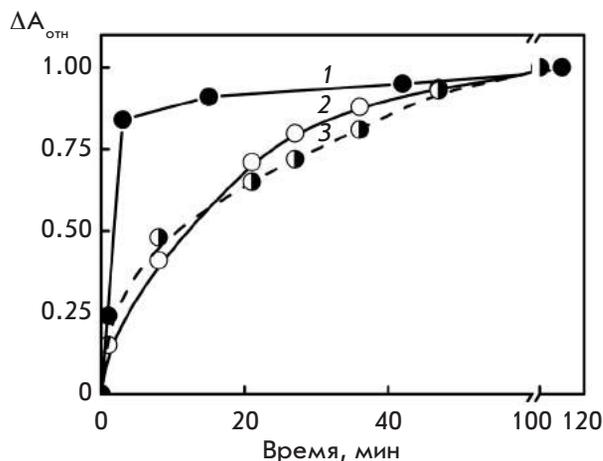


Рис. 7. Зависимость амплитуды полосы в спектре КД ( $\lambda = 270$  нм, кривая 1), полосы ППР ( $\lambda = 550$  нм, кривая 2), а также полосы при  $\lambda = 270$  нм (кривая 3) в спектре поглощения ХЖКД ДНК, обработанной наночастицами Au, от времени их действия на частицы дисперсии.  $C_{\text{ДНК}} = 9$  мкг/мл;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150$  мг/мл; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А

Учитывая полученные результаты и гипотетическую схему (рис. 2), отражающую возможные способы связывания наночастиц Au с молекулами ДНК, фиксированными в структуре частиц ХЖКД, а также изменение амплитуд полос, расположенных в разных областях спектра поглощения (рис. 4), не наблюдаемое в контрольных опытах с участием молекул одноцепочечного полинуклеотида или двухцепочечных молекул ДНК в условиях, препятствующих их конденсации (рис. 1), можно считать, что наночастицы Au малого размера (2 нм) образуют линейные кластеры в частицах ХЖКД.

Наночастицы Au размером 5 и 15 нм, хотя и могут взаимодействовать с «поверхностными» молекулами ДНК (рис. 2А,Б) или концевыми группами молекул ДНК (рис. 2В) квазинематических слоев, оказываются слишком крупными, чтобы встраиваться между молекулами ДНК в этих слоях.

На рис. 7 сопоставлены кривые, характеризующие скорость изменения амплитуды аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК, полосы ППР, а также полосы, расположенной в УФ-области спектра поглощения, при обработке дисперсии наночастицами Au малого размера. Нетрудно видеть, что обработка ХЖКД ДНК наночастицами Au сопровождается двумя одновременно протекающими процессами: быстрым уменьшением аномальной оптической активности ХЖКД ДНК и более медленным развитием полосы ППР. Процесс, регистрируемый по изменению аномальной полосы в спектре КД, завершает-

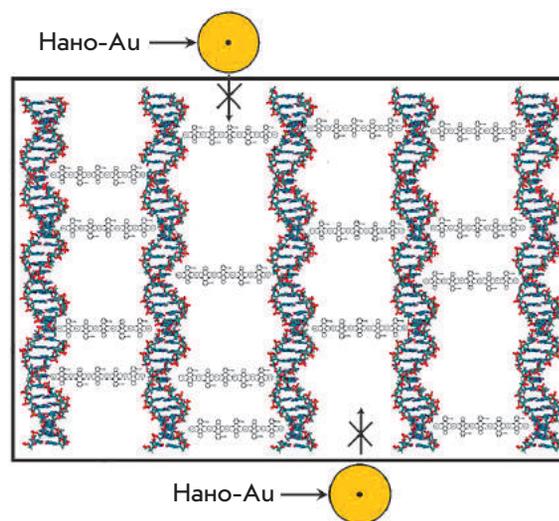


Рис. 8. Схематическое изображение структуры квазинематического слоя в наноконструкции ДНК. Соседние молекулы ДНК, образующие квазинематический слой, сшиты наномостиками, которые не позволяют наночастицам Au проникать внутрь слоя и образовывать кластеры между молекулами ДНК (возможность для их взаимодействия с «поверхностными» молекулами ДНК остается неизменной). Рамка означает наличие осмотического давления ПЭГ-содержащего раствора

ся за 10–15 мин, тогда как процесс развития полосы ППР требует около 60 мин.

Таким образом, кроме быстрого взаимодействия наночастиц Au (любого размера) с частицами ХЖКД ДНК, достаточного для изменения в большей или меньшей степени их аномальной оптической активности, возможно встраивание наночастиц Au малого размера в структуру частиц ХЖКД с образованием кластеров из наночастиц Au.

**Спектры поглощения и кругового дихроизма при действии наночастиц Au на частицы ХЖКД, в которой молекулы ДНК сшиты наномостиками**

Важный вопрос состоит в том, где же располагаются кластеры из наночастиц Au. Можно предполагать, что наночастицы Au малого размера диффундируют в «свободное пространство» между соседними молекулами ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД и именно там образуют кластеры. Этот процесс сопровождается появлением и развитием полосы ППР (рис. 4).

Для проверки высказанного предположения «свободное пространство» между соседними молекулами ДНК в частицах ХЖКД было заполнено достаточно прочными наномостиками [49], состоящими из чередующихся молекул антибиотика и ионов меди

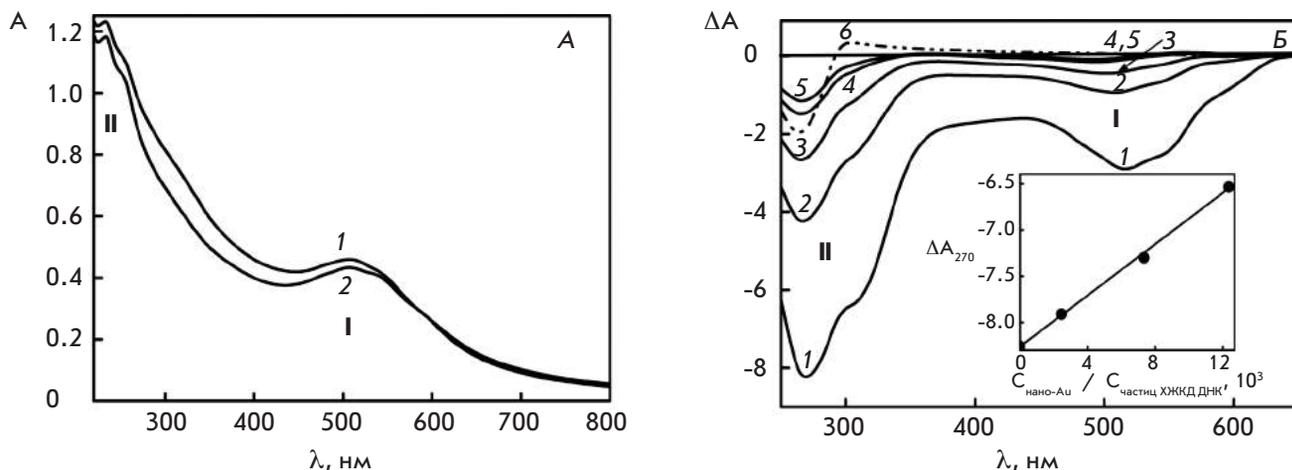


Рис. 9. Спектры поглощения (А) и КД (Б) наноконструкции ДНК, обработанной наночастицами Au (2 нм). А – Обработка наночастицами Au: 1 – 0 мин; 2 – 100 мин. Б – Обработка наночастицами Au в течение 0, 10, 25, 55 и 100 мин (1–5) соответственно, 6 – спектр КД исходной ХЖКД ДНК.  $C_{\text{ДНК}} = 5 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ;  $C_{\text{ДАУ}} = 3.2 \times 10^{-5} \text{ М}$ ;  $C_{\text{Cu}} = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$ ; буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А. На вставке представлена зависимость величины  $\Delta A_{270}$  от соотношения  $C_{\text{нано-Au}} / C_{\text{частиц ХЖКД ДНК}}$  в растворе

(рис. 8). (Такой процесс приводит к образованию наноконструкции ДНК.) В этом случае «свободное пространство» становится недоступным для диффузии наночастиц Au и образования кластеров.

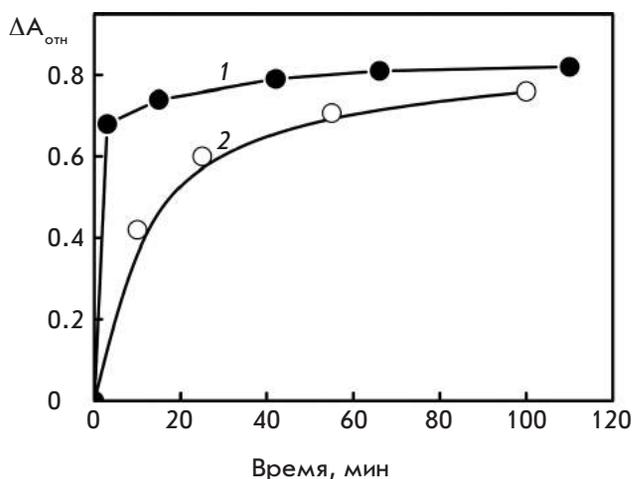
Если высказанное выше предположение о месте расположения кластеров наночастиц Au является правильным, то обработка наноконструкции ДНК наночастицами Au не приведет к изменению амплитуд полос, расположенных как в УФ-, так и в видимой областях спектра поглощения. Действительно, из рис. 9А видно, что в указанном случае никаких существенных изменений в спектре поглощения наноконструкций, сформированных из частиц ХЖКД в результате образования наномостиков между молекулами ДНК, не наблюдается, и полоса ППР (I) не развивается. При этом полоса в УФ-области спектра (II) практически не меняется. Это означает, что наночастицы Au малого размера не могут проникать между соседними молекулами ДНК в квазинематических слоях, поскольку «свободное пространство» занято наномостиками [49].

Можно обратить внимание на то, что наномостики вызывают увеличение прочности пространственной структуры наноконструкций [49]. Поэтому, хотя «поверхностные» молекулы ДНК в частицах наноконструкций доступны для взаимодействия с наночастицами Au, процесс «сбрасывания» спиральной закрутки в случае наноконструкции под действием наночастиц Au, сопровождаемый уменьшением аномальной полосы в спектре КД наноконструкций, потребует большего времени и может завер-

шаться даже при меньшей «глубине» этого процесса. На рис. 9Б сопоставлены спектры КД исходной ХЖКД ДНК (пунктирная кривая 6), наноконструкции ДНК (т.е. ХЖКД, в которой соседние молекулы ДНК сшиты наномостиками; кривая 1) и этой же наноконструкции, обработанной наночастицами Au (кривые 2–5). Сопоставление показывает, что образование наноконструкции ДНК из исходной ХЖКД сопровождается амплификацией полосы, расположенной в УФ-диапазоне, и возникновением второй (дополнительной) полосы в видимой области спектра, обусловленной образованием наномостиков, содержащих хромофоры, поглощающие в этом интервале длин волн [49]. Такая амплификация отражает увеличение угла закрутки соседних квазинематических слоев в результате образования наномостиков [7]. При обработке наноконструкции высокими концентрациями наночастиц Au ( $C_{\text{нано-Au}} = 0.82 \times 10^{14} \text{ частиц/мл}$ ) происходит уменьшение амплитуды полос в УФ- и видимой областях спектра, несмотря на то, что полоса ППР в спектре поглощения отсутствует.

На рис. 10 сопоставлены кинетические кривые, характеризующие изменения аномальной оптической активности, вызванные действием наночастиц Au на исходные ХЖКД ДНК и наноконструкции ДНК. Видно, что в случае исходных частиц ХЖКД ДНК и наноконструкций ДНК глубина и скорости этих процессов различаются, что подтверждает соотношение о стабилизирующей роли наномостиков.

Представленные на рис. 9 результаты еще раз показывают, что наночастицы Au малого разме-



**Рис. 10.** Кинетические кривые, характеризующие изменение аномальной оптической активности, вызванное действием наночастиц Au (2 нм) на исходную ХЖКД ДНК (1) и наноконструкцию ДНК (2). 1 –  $C_{\text{ДНК}} = 9 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ; 2 –  $C_{\text{ДНК}} = 5 \text{ мкг/мл}$ ;  $C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$ ;  $C_{\text{ДАУ}} = 3.2 \times 10^{-5} \text{ М}$ ;  $C_{\text{Cu}} = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$ . Буфер и концентрация наночастиц Au как на рис. 1А

ра могут взаимодействовать с «поверхностными» молекулами двухцепочечных ДНК, индуцируя переход типа холестерик → нематик, даже в случае образования наномостиков между соседними молекулами ДНК, но не могут диффундировать между молекулами ДНК в квазинематических слоях, поскольку «свободное пространство» заполнено наномостиками.

Таким образом, для появления и развития полосы ППР необходимо «свободное пространство» между молекулами ДНК в квазинематических слоях. Именно в этом пространстве формируются кластеры из наночастиц Au.

Как показано выше, взаимодействие наночастиц Au с «поверхностными» молекулами ДНК в частицах ХЖКД индуцирует изменение спирального пространственного расположения соседних квазинематических слоев ДНК, т.е. создание нематической структуры. Не исключено, что в этот момент повышается вероятность того, что в расположенных на нанорасстояниях квазинематических слоях одна (несколько) из правоспиральных, двухцепочечных молекул ДНК в результате вращательной диффузии вокруг своей длинной оси оказывается повернутой на  $180^\circ$  по отношению к своей соседке (соседям). (В этом случае реакционноспособные группы одной молекулы ДНК (1) располагаются в «свободном пространстве» напротив таких же групп ее соседки (2); можно сказать, что происходит «фазиро-

ровка» реакционноспособных групп молекул ДНК по типу «лицом к лицу».) Поэтому формирование кластеров из отрицательно заряженных наночастиц Au в «свободном пространстве» между молекулами ДНК (рис. 2) может быть следствием двух процессов. Во-первых, наночастицы Au могут диффундировать в «свободное пространство» между соседними, «фазированными» молекулами ДНК (1 и 2) (в этом случае можно говорить об одномерной диффузии наночастиц Au между этими молекулами ДНК). Во-вторых, взаимодействие между молекулой ДНК в квазинематическом слое и отрицательно заряженной наночастицей Au малого размера можно условно рассматривать как эквивалентное взаимодействию между плоскостью и сферической частицей [50]. В этом случае поведение наночастицы Au может определяться действием так называемой силы Казимира [51–54].

При любом из вариантов рассмотренных выше процессов (при условии фиксированных условий экспериментов) можно предполагать, что в «свободном пространстве» между молекулами ДНК могут формироваться линейные кластеры из наночастиц Au, причем между соседними наночастицами Au в кластерах может отсутствовать прямой контакт [55]. Формирование таких кластеров из наночастиц Au сопровождается развитием полосы ППР.

Таким образом, разные процессы могут определять «проскальзывание» («втягивание») наночастиц Au в «свободное пространство» между соседними молекулами ДНК в квазинематических слоях.

Если принять высказанное предположение о механизме упорядочения отрицательно заряженных наночастиц Au в квазинематических слоях, то становится понятным, почему наночастицы Au малого размера формируют кластеры в частицах только ХЖКД, образуемых двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот или синтетических полирибонуклеотидов (поли(Г)×поли(С)).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные показывают, что в «свободном пространстве» между соседними двухцепочечными молекулами ДНК, фиксированными в пространственной структуре частиц ХЖКД, формируются кластеры из наночастиц Au малого размера. Этот вывод позволяет рассматривать частицу ХЖКД ДНК как своеобразную матрицу, не только специфически сорбирующую наночастицы Au малого размера, но и обеспечивающую условия для формирования линейных кластеров из таких наночастиц. Не исключено, что именно формирование кластеров определяет цитотоксичность наночастиц Au. ●

Авторы выражают глубокую благодарность В.М. Рудому и О.В. Дементьевой (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН) за синтез высококачественных препаратов наночастиц Au, определение их характеристик, а также за критические замечания в процессе подготовки рукописи.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» в рамках государственного контракта № 14.527.12.0012 от 13 октября 2011 г.; шифр заявки «2011-2.7-527-012-001», а также РФФИ (проект № 11-04-00118-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 318 с.
2. Wiwanitkit V., Sereemasapun A., Rojanathanes R. // Fertil. Steril. 2009. V. 91. № 1. P. e7–e8.
3. Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Малонина Е.А., Кулибин А.Ю., Зеленина И.А., Павлюченкова О.В., Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Евдокимов Ю.М. // Биол. мембраны. 2010. Т. 27. № 4. С. 349–353.
4. Kang B., Mackey M.A., El-Sayed M.A. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. № 5. P. 1517–1519.
5. Tsoli M., Kuhn H., Brandau W., Esche H., Schmid G. // Small. 2005. V. 1. № 8–9. P. 841–844.
6. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Popenko V.I., Rudoy V.M., Dement'eva O.V., Shtykova E.V. // J. Biomater. Nanobiotechnol. 2011. V. 2. № 4. P. 461–471.
7. Евдокимов Ю.М., Салыанов В.И., Семенов С.В., Скуридин С.Г. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. М.: Радиотехника, 2008. 296 с.
8. Livolant F., Leforestier A. // Prog. Polym. Sci. 1996. V. 21. № 6. P. 1115–1164.
9. Leforestier A., Livolant F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 23. P. 9157–9162.
10. Leforestier A., Livolant F. // J. Mol. Biol. 2010. V. 396. № 2. P. 384–395.
11. Schmid G., Klein N., Korste L. // Polyhedron. 1988. V. 7. № 8. P. 605–608.
12. Li H., Rothberg L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 39. P. 14036–14039.
13. Storhoff J.J., Mucic R.C., Mirkin C.A. // J. Cluster Sci. 1997. V. 8. № 2. P. 179–216.
14. Keating C.D., Kovaleski K.M., Natan M.J. // J. Phys. Chem. B. 1998. V. 102. № 47. P. 9404–9413.
15. Harada G., Sakurai H., Matsushita M.M., Izuoka A., Sugawara T. // Chem. Lett. 2002. V. 31. № 10. P. 1030–1031.
16. Tkachenko A.G., Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M.F., Franzen S., Feldheim D.L. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. № 16. P. 4700–4701.
17. Katz E., Willner I. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2004. V. 43. № 45. P. 6042–6108.
18. Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А., Краснов Я.М., Мельников А.Г. // Коллоид. журн. 2000. Т. 62. № 6. С. 765–779.
19. Westcott S.L., Oldenburg S.J., Lee T.R., Halas N. J.J. // Chem. Phys. Lett. 1999. V. 300. № 5–6. P. 651–655.
20. Kelly K.L., do Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C. // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. № 3. P. 668–677.
21. Schmitt J., Decher G., Dressick W.J., Brandow S.L., Geer R.E., Shashidhar R., Calvert J.M. // Adv. Mater. 1991. V. 9. № 1. P. 61–65.
22. Grabar K.C., Freeman R.G., Hommer M.B., Natan M.J. // Anal. Chem. 1995. V. 67. № 4. P. 735–743.
23. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. // Discuss. Faraday Soc. 1951. V. 11. P. 55–75.
24. Brown K.R., Walter D.G., Natan M.J. // Chem. Mater. 2000. V. 12. № 2. P. 306–313.
25. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2301–2309.
26. Noginov M.A., Zhu G., Belgrave A.M., Bakker R., Shalaev V.M., Narimanov E. E., Stout S., Herz E., Suteewong T., Wiesner U. // Nature. 2009. V. 460. № 7259. P. 1110–1113.
27. Grasso D., Fasone S., La Rosa C., Salyanov V. // Liq. Crystals. 1991. V. 9. № 2. P. 299–305.
28. Grasso D., Campisi R.G., La Rosa C. // Thermochim. Acta. 1992. V. 19. № 1. P. 239–245.
29. Loweth C.J., Caldwell W.B., Peng X., Alivisatos A.P., Schultz P.G. // Angew. Chem. Int. Ed. 1999. V. 38. № 12. P. 1808–1812.
30. Kumar A., Pattarkine M., Bhadbhade M., Mandale A.B., Ganesh K.N., Datar S.S., Dharmadhikari C.V., Sastry M. // Adv. Mater. 2001. V. 13. № 5. P. 341–344.
31. Liu Y., Meyer-Zaika W., Franzka S., Schmid G., Tsoli M., Kuhn H. // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. № 25. P. 2853–2857.
32. Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Рудой В.М., Дементьева О.В., Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Кузьмин В.А., Попенко В.И., Евдокимов Ю.М. // Докл. АН. 2010. Т. 432. № 6. С. 838–841.
33. Жеренкова Л.В., Комаров П.В., Халатур П.Г. // Коллоид. журн. 2007. Т. 69. № 5. С. 753–765.
34. Herne T.M., Tarlov M.J. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. № 38. P. 8916–8920.
35. Petrovykh D.Y., Kimura-Suda H., Whitman L.J., Tarlov M.J. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. № 17. P. 5219–5226.
36. Parak W.J., Pellegrino T., Micheel C.M., Gerion D., Williams S.C., Alivisatos A. Paul. // Nano Lett. 2003. V. 3. № 1. P. 33–36.
37. Kira A., Kim H., Yasuda K. // Langmuir. 2009. V. 25. № 3. P. 1285–1288.
38. Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J. // Nature. 1996. V. 382. № 6592. P. 607–609.
39. Sastry M., Kumar A., Datar S., Dharmadhikari C.V., Gahesh K.N. // Appl. Phys. Lett. 2001. V. 78. № 19. P. 2943–2945.
40. Warner M.G., Hutchison J.E. // Nat. Materials. 2003. V. 2. P. 272–277. doi:10.1038/nmat853.
41. Link S., El-Sayed M.A. // J. Phys. Chem. B. 1999. V. 103. № 40. P. 8410–8426.
42. Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. // Anal. Chem. 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221.
43. Rechberger W., Hohenau A., Leitner A., Krenn J.R., Lamprecht B., Aussenegg F.R. // Opt. Commun. 2003. V. 220. № 1–3. P. 137–141.
44. Kamat P.V. // J. Phys. Chem. B. 2002. V. 106. № 32. P. 7729–7744.
45. Storhoff J.J., Lazarides A.A., Mucic R.C., Mirkin C.A., Letsinger R.L., Schatz G.C. // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. № 19. P. 4640–4650.
46. Grabar K.C., Smith P.C., Musick M.D., Davis J.A., Walter

- D.G., Jackson M.A., Guthrie A.P., Natan M.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. № 5. P. 1148–1153.
47. Biggs S., Mulvaney P., Zukovski C.F., Grieser F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 20. P. 9150–9157.
48. Thompson D.W., Collins I.R. // *J. Colloid. Interface Sci.* 1992. V. 152. № 1. P. 197–204.
49. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Скуридин С.Г. *Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК*. М.: Сайнс-Пресс, 2010. 254 с.
50. Maia Neto P.A., Lambrecht A., Reynaud S. // *Phys. Rev. A.* 2008. V. 78. № 1. 012115. [4 pages].
51. Casimir H.B.G. // *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 1948. V. 51. P. 793–795.
52. Мостепаненко В.М., Трунов Н.Н. // *Успехи физ. наук.* 1988. Т. 156. № 5. С. 385–426.
53. Rodriguez A.W., Capasso F., Johnson S.G. // *Nat. Photonics.* 2011. V. 5. № 4. P. 211–221.
54. Dzyaloshinskii I.E., Lifshitz E.M., Pitaevskii L.P. // *Adv. Phys.* 1961. V. 10. № 38. P. 165–209.
55. Chan H.B., Bao Y., Zou J., Cirelli R.A., Klemens F., Mansfield W.M., Pai C.S. // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 101. № 3. 030401. [4 pages].

УДК 579

# Динамика развития метаногенного сообщества в процессе анаэробной утилизации отходов агропромышленного комплекса

А. М. Зиганшин<sup>1\*</sup>, Э. Э. Зиганшина<sup>1</sup>, С. Кляйнштаубер<sup>2</sup>, Ю. Протер<sup>3</sup>, О. Н. Ильинская<sup>1</sup><sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань,

ул. Кремлевская, 18, Россия

<sup>2</sup>Институт им. Гельмгольца по исследованию окружающей среды, 04318, Лейпциг,

Permoser str. 15, Германия

<sup>3</sup>Немецкий центр исследования биомассы, 04347, Лейпциг, Torgauer str. 116, Германия

\*E-mail: a.ziganshin06@fulbrightmail.org

Поступила в редакцию 08.08.2012

**РЕФЕРАТ** С использованием анализа полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов архейных генов 16S рРНК (T-RFLP-анализа) изучены метаногенные археи, участвующие в анаэробном разложении навоза крупного рогатого скота и соломы кукурузы. Оценены биологическое разнообразие и динамика развития метаногенных сообществ, участвующих в анаэробной деструкции органических отходов агропромышленного комплекса с образованием биогаза в лабораторных установках. T-RFLP-анализ в сочетании с созданием библиотек клонов архейных генов 16S рРНК показал, что метаногенный консорциум в основном состоял из представителей родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus* с доминированием *Methanosarcina* spp. на протяжении всего эксперимента.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** архейные гены 16S рРНК, T-RFLP-анализ, продукция биогаза, метаногены.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** T-RFLP-анализ – анализ полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов; ОТЕ – операционная таксономическая единица; КРС – крупный рогатый скот; оСВ – органическое сухое вещество.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из эффективных методов, ведущих к снижению отрицательного влияния отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности на окружающую среду, является их обработка в анаэробных условиях. Анаэробная переработка отходов сопровождается деструкцией значительной части органических компонентов и продукцией возобновляемого источника энергии – биогаза, состоящего из метана (50–75%) и углекислого газа (25–50%) с незначительными примесями. В отличие от биоэтанола и биодизеля, производимых в основном из энергетических сортов растений, биогаз получают при утилизации остаточной биомассы и различных органических отходов [1–7]. К таким отходам относится, в частности, навоз крупного рогатого скота (КРС). Однако из-за низкой биоразлагаемости утилизация навоза в анаэробных реакторах отличается незначительным выходом биогаза. Совместная анаэробная утилизация навоза и растительной биомассы способствует ускорению гидролиза субстрата и оптимизации распределения питательных веществ в биореак-

торе, что активизирует рост микроорганизмов и выход биометана [8, 9]. В последние годы одновременная биодеградация нескольких различных субстратов интенсивно изучается [9–13].

Первые три стадии анаэробной деструкции комплексного субстрата – гидролиз, ацидогенез и ацетогенез – ведут бактериальные сообщества, четвертую стадию осуществляет группа ацетокластических и гидрогенотрофных метаногенов, которые поглощают ацетат, молекулярный водород, углекислый газ и выделяют метан [1, 6, 14]. Независимо от режима сбраживания (психро-, мезо- или термофильного), а также состава субстрата доминирующими участниками метаногенеза являются представители *Methanomicrobiales* и/или *Methanosarcinales* [2, 5, 7, 15–18]. Однако данные об изменениях структуры микробных ассоциаций в ходе метаногенной ферментации весьма скудны.

Настоящая работа посвящена изучению путей утилизации отходов сельского хозяйства – навоза и кукурузной соломы – с образованием биогаза в лабораторных биогазовых реакторах, а также исследо-

ванию разнообразия, структуры и динамики метаногенных сообществ, участвующих в данном процессе, с применением современных методов молекулярной биологии. Определение состава и динамики микробных сообществ биогазовых реакторов совместно с анализом деструкции субстрата направлено на выявление возможностей интенсификации анаэробного процесса. Использование универсального филогенетического маркера 16S рРНК, функциональных генов-маркеров и T-RFLP-анализа (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, или полиморфизм длин концевых рестрикционных фрагментов) [19, 20] внесет вклад в установление состава и временных изменений микробного консорциума.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Параметры биореакторов

В табл. 1 представлены основные технологические параметры анаэробной переработки навоза КРС и соломы кукурузы. Во всех биореакторах поддерживали мезофильный режим (38°C). В качестве субстрата для биореакторов R 4.13 и R 4.14 использовали навоз КРС и солому кукурузы, тогда как для биореакторов R 4.15 и R 4.16 – навоз КРС и экструдированную солому кукурузы. Внесение новой порции субстрата и выгрузку переработанной смеси проводили ежедневно; количество перерабатываемого субстрата поддерживали на уровне 30 л; время пребывания субстрата в реакторах составляло 35 сут. Выход биогаза, его состав и pH измеряли каждый день, тогда как концентрацию органических кислот и ионов аммония – 2 раза в неделю.

### Аналитические методы

Производство биогаза измеряли с использованием барабанного газового счетчика RitterTG 05 («Vochum», Германия); состав биогаза определяли с использованием инфракрасного газового анализатора GA 94 («Ansyco», Германия). Концентрацию ионов аммония определяли после окрашивания жидкой фазы содержимого биореакторов реагентом Несслера, образцы далее анализировали с использованием спектрофотометра DR/2000 («HachCompany», США) при 425 нм. Общую концентрацию органических кислот измеряли титрованием 0.025–0.1 М раствором серной кислоты в диапазоне pH от 4.5 до 3.5 с помощью титратора TitrationExcellence T 90 («Mettler-Toledo», Швейцария). Летучие органические кислоты анализировали на газовом хроматографе 5890 series IIGC («Hewlett Packard», США), оснащенном автоматическим пробоотборником HS40 («Perkin Elmer», США) и колонкой Agilent HP-FFAP (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм), в соответствии с нашей прежней работой [7].

### Экстракция и очистка суммарной ДНК

Образцы из четырех реакторов отбирали раз в месяц и сразу же использовали для экстракции и очистки ДНК. Биомассу переработанной смеси осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 10 мин. Далее суммарную ДНК экстрагировали и очищали с использованием FastDNASPIN Kit for soil («Qbiogene», Германия) согласно инструкции производителя. Общее количество выделенной и очищенной ДНК оценивали с использованием УФ-видимого спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («PecLab», Германия).

### Аmplификация, клонирование и секвенирование генов 16S рРНК архей

Все молекулярные манипуляции были проведены согласно нашей ранней публикации [7]. Гены 16S рРНК архей амплифицировали с помощью ПЦП с суммарной ДНК в термоциклере DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler («Bio-Rad»), используя комбинацию универсальных праймеров UniArc21F (5'-ТТЦГКТТГАТСССГСРГ-3') и UniArc931R (5'-СССГССААТТССТТТНАГ-3') и 2 × TaqMasterMix («Qiagen», Германия). Состав реакционной смеси: 6 мкл 2 × TaqMasterMix, 0.5 мкл UniArc21F (5 пмоль/мкл), 0.5 мкл UniArc931R (5 пмоль/мкл), 4 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл в 100 раз разбавленной ДНК (эквивалентно 1–3 нг). Реакцию амплификации начинали с денатурации при 95°C в течение 5 мин, затем проводили 35 циклов: денатурация при 94°C в течение 1 мин, отжиг при 54°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 20 мин.

ПЦП-продукты очищали с использованием QIAGEN PCR Purification Kit и клонировали с использованием QIAGEN PCR Cloning Kit («QIAGEN», Германия). После клонирования генов 16S рРНК архей проанализировали наличие вставки нужного размера в позитивных клонах с использованием вектор-специфичных праймеров M13uni(-21) (5'-TGТААААСГАСГССАГТ-3') и M13rev(-29) (5'-САГГАААСАГСТАТГАСС-3'). Далее M13-ампликоны в количестве 1 мкл обрабатывали эндонуклеазой HaeIII («New England Biolabs», Германия) и разделяли электрофоретически в гелях Phor-агарозы («Biozym», Германия). Длины рестрикционных фрагментов анализировали при помощи программ Phoretix™ 1D Database Version 2.00 и Phoretix™ 1D Advanced Version 5.20 («Nonlinear Dynamics», Великобритания), клоны объединяли в кластеры и строили дендограммы. Репрезентативные клоны из больших кластеров отбирали для последующего определения их нуклеотидных последовательностей.

Таблица 1. Основные технологические параметры анаэробной переработки навоза КРС и кукурузной соломы

Реактор*	Нагрузка по органике**, Г <sub>осв</sub> сут <sup>-1</sup>	Состав субстрата, г сут <sup>-1</sup>			Выход био- газа при н.у., л Г <sup>-1</sup> <sub>осв</sub>	Состав биогаза			рН	Органи- ческие кислоты, г л <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, г л <sup>-1</sup>
		навоз КРС	солома	сумма***		CH <sub>4</sub> , %	CO <sub>2</sub> , %	H <sub>2</sub> S, м.д.			
R 4.13	74.1	723.6	28.2	857	0.40	58.7	40.2	3450	7.63	1.49	1.20
	71.2	518.7	26.3	857	0.36	59.8	38.7	2216	7.50	1.90	1.24
	71.7	694.6	26.3	857	0.33	55.6	42.9	2145	7.61	1.80	1.16
R 4.14	74.1	723.6	28.2	857	0.40	59.3	39.8	4183	7.66	1.42	1.22
	71.2	518.7	26.3	857	0.38	58.4	40.2	1928	7.53	1.66	1.28
	71.7	694.6	26.3	857	0.37	56.7	42.1	2092	7.58	1.43	1.31
R 4.15	72.1	723.6	83.7	857	0.39	58.1	41.1	~5000	7.75	1.54	1.47
	68.6	518.7	78.1	857	0.39	59.3	39.2	2234	7.56	1.28	1.39
	69.1	694.6	78.1	857	0.39	56.8	42.6	2373	7.74	1.37	1.26
R 4.16	72.1	723.6	83.7	857	0.41	58.6	40.6	4558	7.76	1.51	1.54
	68.6	518.7	78.1	857	0.38	59.0	40.1	2056	7.54	1.53	1.36
	69.1	694.6	78.1	857	0.39	57.2	41.5	3155	7.61	1.37	1.27

\* Параметры биореакторов представлены в трех точках отбора проб, когда метаногенные сообщества были проанализированы (за исключением выхода биогаза, состава биогаза и рН, данные которых представлены как средние значения за 1 нед.).

\*\* Органическое сухое вещество.

\*\*\* Вода добавлена до конечной концентрации 857 мл сут<sup>-1</sup>.

ПЦР-продукты репрезентативных клонов очищали с использованием Promega PCR Purification Kit («Promega», США). Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК определяли с применением набора реактивов BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). В качестве разделительной матрицы использовали полимер POP-6<sup>TM</sup>. Программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [21] далее применяли для поиска сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank. Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) [22] использовали для определения таксономической принадлежности микроорганизмов.

#### T-RFLP-анализ

T-RFLP-анализ проводили в соответствии с нашей предыдущей работой [7]. С этой целью гены

16S рРНК архей амплифицировали с использованием пары универсальных праймеров UniArc21F-FAM и UniArc931R и 2 × TaqMasterMix («Qiagen», Германия). Параметры ПЦР-реакции указаны выше. UniArc21F-FAM (прямой праймер) помечен флуорофором FAM (phosphoramidite fluorochrome-5-carboxyfluorescein) на 5'-конце. Ампликоны архейных генов 16S рРНК, содержащие флуорофор FAM, очищали с использованием набора SureCleanPlus («Bio-line», Германия), далее обрабатывали рестриктазами MseI и HaeIII («New England Biolabs», Германия). После 16-часовой инкубации при 37°C фрагменты ДНК осаждали 3 М ацетатом натрия (рН 5.5) и абсолютным этанолом. После удаления супернатанта осадок высушивали в вакууме и подсушенные фрагменты ДНК ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мкл Hi-Di-формамида и 0.25 мкл GeneScan<sup>TM</sup> – 500 ROX<sup>TM</sup> STANDARD или MapMarker<sup>®</sup> 1000 (наборы стандартов определенного размера). Пробы де-

Таблица 2. Результаты секвенирования клонированных генов 16S рРНК архей и экспериментально полученные концевые рестрикционные фрагменты (T-RF)

Клон, п.н.	Ближайший представитель (номер в базе данных GenBank) / процент совпадения	Таксономическая принадлежность в соответствии с RDP 10	MseI-T-RF, п.н.	HaeIII-T-RF, п.н.
ar_B9 (863)	Uncultured archaeon clone: FA69 (AB494258) / 99%	<i>Methanoculleus</i> sp.	37	67
ar_A1 (864)	Uncultured <i>Methanoculleus</i> sp. clone: DMMR219 (HM218939) / 99%	<i>Methanoculleus</i> sp.	36	67
ОТЕ 1		<i>Methanoculleus</i> sp. I	36/37	67
ar_A2 (863)	Uncultured archaeon clone: MTSArc_G8 (EU591664) / 99%	<i>Methanoculleus</i> sp.	499	67
ОТЕ 2		<i>Methanoculleus</i> sp. II	499	67
ar_E12 (864)	Uncultured archaeon clone: WA50 (AB494245) / 100%	<i>Methanocorpusculum</i> sp.	97	241
ОТЕ 3		<i>Methanocorpusculum</i> sp.	97	241
ar_E10 (567)	Uncultured euryarchaeote clone: B35_F_A_A05 (EF552199) / 99%	<i>Methanosarcina</i> sp.	557	220
ar_H2 (873)	Uncultured euryarchaeote clone: B35_F_A_A05 (EF552199) / 99%	<i>Methanosarcina</i> sp.	557	220
ОТЕ 4		<i>Methanosarcina</i> sp. I	557	220
ar_E6 (873)	Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99%	<i>Methanosarcina</i> sp.	859	220
ar_F10 (873)	Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99%	<i>Methanosarcina</i> sp.	858	220
ОТЕ5		<i>Methanosarcina</i> sp. II	858/859	220
ar_G8 (874)	Uncultured archaeon clone: SA42 (AB494252) / 99%	<i>Methanosarcina</i> sp.	877	220
ОТЕ6		<i>Methanosarcina</i> sp. III	877	220

натурировали при 95°C в течение 5 мин, охлаждали на льду (примерно 5 мин) и анализировали на генетическом анализаторе ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). В качестве разделительной матрицы использовали полимер POP-6™. Полученные T-RFLP-граммы анализировали при помощи программы GeneMapper Version 3.7 («Applied Biosystems»). Теоретические T-RF-значения репрезентативных фило типов, представленных в библиотеке клонов, были оценены программой NEBcutter Version 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) и подтверждены экспериментально T-RFLP-анализом соответствующих клонов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование альтернативных возобновляемых источников энергии, в частности различных видов органических отходов, является необходимой составляю-

щей «зеленых технологий» производства биотоплива [1]. В настоящей работе с целью анализа динамики развития метаногенных ассоциаций проведена анаэробная конверсия навоза и соломы кукурузы в модельных мезофильных биореакторах.

В табл. 1 представлены основные технологические параметры анаэробного разложения органических субстратов сельского хозяйства. Анаэробную деструкцию биомассы проводили в четырех лабораторных ферментерах с рабочей емкостью 30 л при 38°C. В реакторах R 4.13 и R 4.14 проводили совместную ферментацию следующих субстратов – навоза КРС и соломы кукурузы, а в реакторах R 4.15 и R 4.16 анаэробному разложению подвергали навоз и экструдированную солому кукурузы. Нагрузка по органике для реакторов R 4.13 и R 4.14 варьировала в диапазоне 71.2–74.1 г<sub>о.с.в.</sub> сут<sup>-1</sup> (органическое сухое вещество), в то время как для реакторов R 4.15

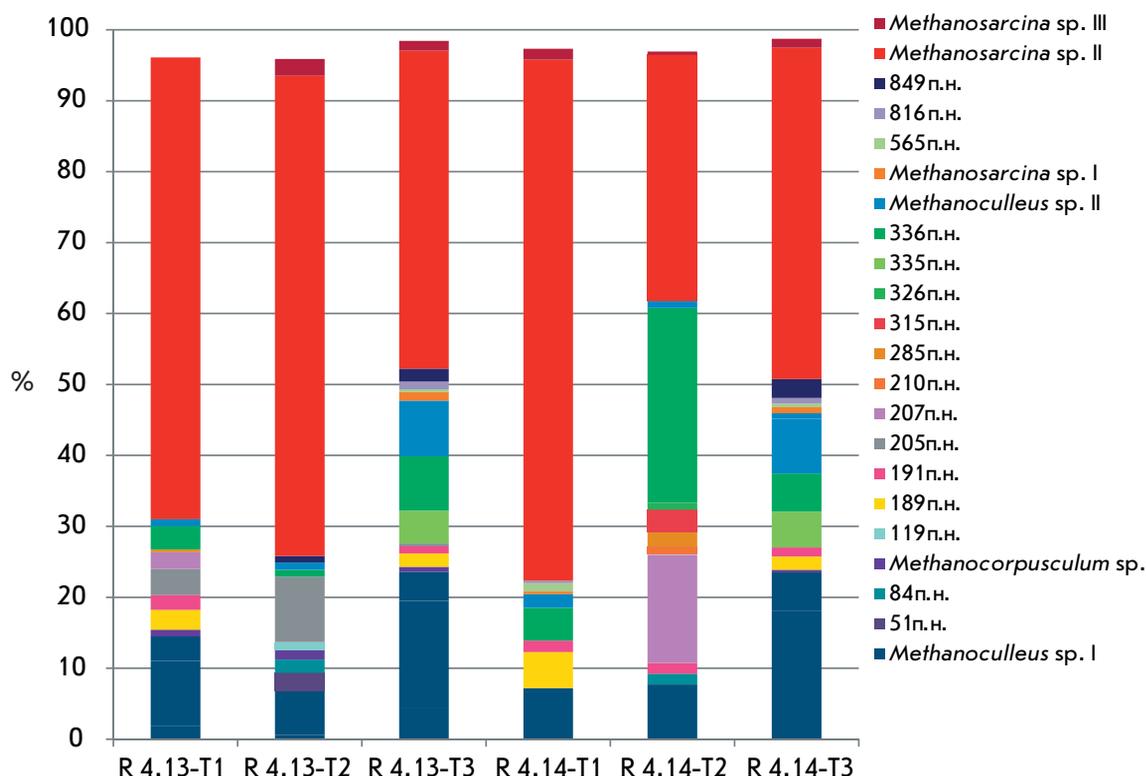


Рис. 1. Динамика развития метаногенного сообщества в ферментерах R 4.13 и R 4.14 на основе T-RFLP-анализа (после обработки ампликонов генов 16S рРНК ферментом MseI)

и R 4.16 общая нагрузка по органике была ниже и составила 68.6–72.1 г<sub>оСВ</sub> сут<sup>-1</sup>. На протяжении всего эксперимента время пребывания субстрата в реакторах составляло 35 дней. В зависимости от вносимого органического вещества выход биогаза из анализируемых ферментеров варьировал в диапазоне от 0.33 до 0.41 л г<sup>-1</sup><sub>оСВ</sub> с содержанием метана 56–60%. Как видно из табл. 1, во всех биореакторах значения рН поддерживали на уровне ~7.5–7.8, количество органических кислот – в диапазоне ~1.3–1.9 г л<sup>-1</sup>, а концентрацию ионов аммония – в пределах ~1.2–1.5 г л<sup>-1</sup>. Эти параметры благоприятны для процесса метаногенеза [23].

С помощью амплификации, клонирования, рестрикционных анализов и секвенирования генов 16S рРНК архей, полученных из суммарной ДНК содержимого биореакторов, проведена оценка биологического разнообразия и динамики метаногенных сообществ, участвующих в анаэробной деструкции органических отходов агропромышленного комплекса – навоза КРС и соломы кукурузы. Определение структуры метаногенной ассоциации осуществляли в трех точках отбора проб с интервалом отбора 1 мес.

Амплификация, клонирование, секвенирование генов 16S рРНК, а также T-RFLP-анализ выявили относительно большое разнообразие представителей

архей в реакторах. При проведении T-RFLP-анализа ампликоны генов 16S рРНК архей, содержащие флуорофор FAM, обрабатывали эндонуклеазами MseI и HaeIII. Принадлежность пиков на общей T-RFLP-грамме к определенным филогенетическим группам микроорганизмов определяли по длине соответствующих концевых рестрикционных фрагментов (T-RF) генов 16S рРНК клонов. В общей сложности из клонотеки были отобраны девять клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. Эти клоны были сгруппированы в шесть операционных таксономических единиц (ОТЕ) на основе длин T-RF (табл. 2). При определении таксономической принадлежности три филопита отнесли к порядку Methanomicrobiales (ОТЕ 1, ОТЕ 2, ОТЕ 3) и три – к порядку Methanosarcinales (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6). С помощью T-RFLP-анализа генов 16S рРНК с использованием рестриктазы MseI в ферментерах выявлено до 22 различных T-RF-профилей (с встречаемостью более 1%). Поскольку основные T-RF в реакторах были идентифицированы, мы определили метаногены, играющие ключевую роль в продукции биогаза (табл. 2).

На рис. 1 представлено распределение групп метаногенов (динамика развития сообщества) в ходе анаэробной деструкции навоза и соломы (R 4.13 и R 4.14). Это распределение получено на основе про-

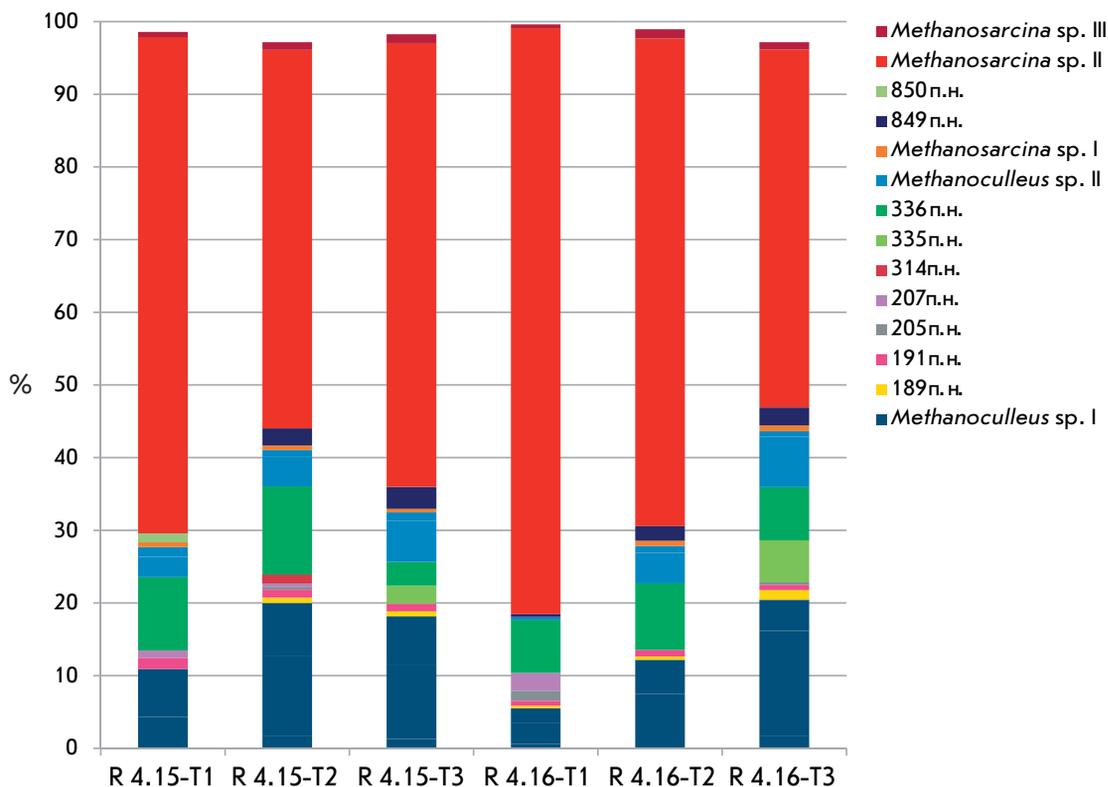


Рис. 2. Динамика развития метаногенного сообщества в ферментерах R 4.15 и R 4.16 на основе T-RFLP-анализа (после обработки ампликонов генов 16S рРНК ферментом MseI)

филей MseI-рестрикции (результаты, полученные при использовании фермента HaeIII, не показаны). В первой отобранной пробе, когда нагрузка по органике составила  $74.1 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$ , T-RFLP-анализ позволил выявить преобладание метаногенов рода *Methanosarcina* и гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoculleus* в архейном сообществе биореакторов R 4.13 и R 4.14. Так, общее соотношение представителей *Methanosarcina* sp. (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6) и *Methanoculleus* sp. (ОТЕ 1, ОТЕ 2) в реакторе R 4.13 составило 65 и 15% от общих T-RF-площадей пиков соответственно. В реакторе R 4.14 были идентифицированы метаногены *Methanosarcina* sp. и *Methanoculleus* sp. – 75 и 9% соответственно. Другие представители архей с низкой встречаемостью (1–3%) были отнесены к минорным группам сообщества (рис. 1). Снижение вносимой органики до  $71.2 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$  и последующее ее увеличение до  $71.7 \text{ г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$  привело к изменению состава микробного сообщества. Так, относительная частота встречаемости представителей рода *Methanosarcina* (ОТЕ 4, ОТЕ 5, ОТЕ 6) в двух следующих точках отбора проб составила 70/47 и 35/49% для R 4.13 и R 4.14 соответственно. Относительная частота встречаемости видов *Methanoculleus* (ОТЕ 1, ОТЕ 2) в R 4.13 и R 4.14 составила 8/31 и 9/32% соответственно (две следующие точки отбора проб). Среди минорных ассоциаций обнаружены

и представители гидрогенотрофных метаногенов, относящихся к роду *Methanocorpusculum*, однако на их долю приходилось менее 2% от общей площади T-RF-пиков. Кроме того, на T-RFLP-граммах обнаружен мажорный пик, соответствующий фрагменту длиной 336 п.н.; однако этого фило типа не было среди клонированных генов 16S рРНК архей и, следовательно, он был отнесен к неидентифицированной группе метаногенного сообщества.

Как видно из рис. 2, структура метаногенных ассоциаций биореакторов R 4.15 и R 4.16, утилизирующих навоз и экструдированную солому, также была представлена сходными группами, обнаруженными в R 4.13 и R 4.14. Нагрузка по органике в трех точках отбора проб для R 4.15 и R 4.16 составила 72.1, 68.6 и 69.1  $\text{г}_{\text{оСВ}} \text{ сут}^{-1}$  соответственно. Преобладающими в сообществе ферментера R 4.15 стали представители рода *Methanosarcina* (70, 54 и 63% встречаемости в трех точках отбора проб соответственно) и рода *Methanoculleus* (15, 25 и 25% встречаемости в трех точках отбора проб соответственно). Как и в реакторе R 4.15, основными таксонами биореактора R 4.16 были представители рода *Methanosarcina* (81, 69 и 51%), а также представители рода *Methanoculleus* (6, 17 и 28%). Как и в реакторах R 4.13 и R 4.14, отмечена высокая встречаемость T-RF-пика размером 336 п.н., однако таксономическая группа архей, соот-

ветствующая данному фрагменту рестрикционного профиля, не определена.

Полученные результаты обосновывают возможность эффективной совместной утилизации навоза и соломы кукурузы с получением биогаза. Нами установлено, что доминирующими представителями метаногенов на протяжении всего ферментационного процесса являются представители родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus*. Кроме этого, впервые отслежена динамика метаногенного сообщества в ходе утилизации органических отходов. Микроорганизмы *Methanoculleus* sp. используют водород и диоксид углерода для роста и продуцируют метан [2], тогда как метаногены рода *Methanosarcina* в основном рас-

щепляют ацетат с образованием метана и диоксид углерода либо утилизируют водород, диоксид углерода и метилированные соединения с образованием метана [24]. По-видимому, повышенная концентрация органических кислот в реакторах подавляет представителей строго ацетокластического рода *Methanosaeta* и стимулирует развитие *Methanosarcina* spp. [14, 25]. ●

*Работа поддержана грантом Правительства Республики Татарстан «Алгарьш» (2010 г.) и стипендией совместной программы DAAD и Министерства образования и науки РФ (Программа «Михаил Ломоносов II», 2011 г.).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 77. P. 23–35.
- Krause L., Diaz N.N., Edwards R.A., Gartemann K.H., Krömeke H., Neuweiger H., Pühler A., Runte K.J., Schlüter A., Stoye J., et al. // J. Biotechnol. 2008. V. 136. P. 91–101.
- Ahn H.K., Smith M.C., Kondrad S.L., White J.W. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 160. P. 965–975.
- Bedoya I.D., Arrieta A.A., Cadavid F.J. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 6624–6629.
- Goberna M., Insam H., Franke-Whittle I.H. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 2566–2572.
- Weiland P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. P. 849–860.
- Ziganshin A.M., Schmidt T., Scholwin F., Il'inskaya O.N., Harms H., Kleinstüber S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. P. 2039–2052.
- Holm-Nielsen J.B., Seadi T.A., Oleskowicz-Popiel P. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 5478–5484.
- El-Mashad H.M., Zhang R. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. P. 4021–4028.
- Gomez X., Moran A., Cuetos M.J., Sanchez M.E. // J. Power Sources. 2006. V. 157. P. 727–732.
- Davidsson A., Löfstedt C., la Cour Jansen J., Gruvberger C., Aspegren H. // Waste Manage. 2008. V. 28. P. 986–992.
- Fountoulakis M.S., Petousi I., Manios T. // Waste Manage. 2010. V. 10. P. 1849–1853.
- Nayono S.E., Gallert C., Winter J. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. P. 6998–7004.
- Demirel B., Scherer P. // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2008. V. 7. P. 173–190.
- O'Reilly J., Lee C., Collins G., Chinalia F., Mahony T., O'Flaherty V. // Water Res. 2009. V. 43. P. 3365–3374.
- Kröber M., Bekel T., Diaz N.N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D., Runte K.J., Viehöver P., Pühler A., Schlüter A. // J. Biotechnol. 2009. V. 142. P. 38–49.
- Lee C., Kim J., Hwang K., O'Flaherty V., Hwang S. // Water Res. 2009. V. 43. P. 157–165.
- Nettmann E., Bergmann I., Pramschüfer S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 2540–2548.
- Abdo Z., Schüette U.M., Bent S.J., Williams C.J., Forney L.J., Joyce P. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 929–938.
- Culman S.W., Bukowski R., Gauch H.G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D.H. // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10. P. 171–180.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 5261–5267.
- Gerardi M.H. The microbiology of anaerobic digesters. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003. 177 p.
- Kendall M.M., Boone D.R. // The order Methanosarcinales. The Prokaryotes – a Handbook on the Biology of Bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. / Eds Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006. P. 244–256.
- Karakashev D., Batstone D.J., Angelidaki I. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 331–338.

## 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).
- Во всем тексте, кроме даты поступления, все даты в виде «число.месяц.год» набираются 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 (АТФ, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

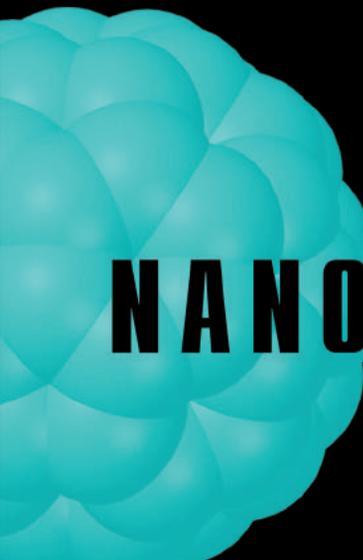


ФЕСТИВАЛЬ ИДЕЙ И ЗНАНИЙ  
**ИСКУССТВО НАУКИ**  
**2013**



**ПЕРЕЗАГРУЗКА...**





# 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